



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Otrzymywanie oraz charakterystyka liposomów - potencjalnych nośników leków w celu zwiększenia skuteczności terapii fotodynamicznej

Author: Patrycja Kozub

Citation style: Kozub Patrycja. (2015). Otrzymywanie oraz charakterystyka liposomów - potencjalnych nośników leków w celu zwiększenia skuteczności terapii fotodynamicznej. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

UNIwersytet Śląski w Katowicach
Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego

Patrycja Kozub

*Otrzymywanie oraz charakterystyka liposomów – potencjalnych
nośników leków w celu zwiększenia skuteczności terapii
fotodynamicznej.*

*Praca wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Alicji Ratusznej
oraz dr Agnieszki Szurko
w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego.*

Katowice 2015

UPGOW – Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy
Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Autorka otrzymała stypendium w ramach projektu UPGOW – Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy. Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.



Autorka otrzymała stypendium w ramach projektu TWING – program stypendialny Transfer Wiedzy Nauka-Gospodarka. Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego CZŁOWIEK – NAJLEPSZA INWESTYCJA.



Podziękowania

- Najserdeczniejsze podziękowania pragnę złożyć promotorowi pracy Pani prof. dr hab. Alicji Ratusznej za zaproponowanie tematu badawczego, umożliwienie realizacji pracy pod Jej kierunkiem oraz za stałą opiekę i cenne uwagi. Dziękuję także za cierpliwość, życzliwość, wyrozumiałość oraz wsparcie okazane podczas pisania niniejszej pracy.
- Serdecznie dziękuję promotorowi wspomagającemu Pani dr Agnieszce Szurko za wprowadzenie mnie w tematykę biologii nowotworów, pomoc udzieloną podczas przeprowadzania eksperymentów biologicznych, cenne uwagi i dyskusje naukowe.
- Wyrazy wdzięczności dla Pana prof. dr hab. Franza-Petera Montforts za możliwość wykorzystania syntezowanych przez Niego chloryn do badań fizycznych i biologicznych.
- Serdeczne podziękowania dla Pana prof. dr hab. Arkadiusza Kozubka i Pana dr hab. Jerzego Gubernatora za przekazaną wiedzę na temat technologii liposomowej. Panu Doktorowi dziękuję również za poświęcony czas, cenne rady, wsparcie, wyrozumiałość oraz bardzo istotne uwagi podczas wykonywania eksperymentów z nośnikami liposomowymi.
- Pragnę również serdecznie podziękować prof. dr hab. Zygmuntowi Gryczyńskiemu oraz jego doktorantom z Texas Christian University za pomoc udzieloną podczas przeprowadzania eksperymentów w trakcie mojego pobytu w Teksasie oraz za cenne uwagi, dyskusje naukowe i okazaną gościnność.
- Dziękuję wszystkim kolegom i koleżankom z Zakładu Fizyki Ciała Stałego oraz Zakładu Biofizyki i Fizyki Molekularnej za miłą i serdeczną atmosferę pracy.
- Rodzinie oraz Najbliższym dziękuję za troskę oraz wsparcie w trudnych chwilach.

LISTA PUBLIKACJI

1. M. Rojkiewicz, P. Kuś, **P. Kozub**, M. Kempa: *The synthesis of new potential photosensitizers [1]. Part2. Tetrakis-(hydroxyphenyl)porphyrins with long alkylchain in the molecule.* Dyes and Pigments. 2013, 99, 627-635.
2. M. Dulski, M. Kempa, **P. Kozub**, J. Wójcik, M. Rojkiewicz, P. Kuś, A. Szurko, A. Ratuszna, R. Wrzalik: *DFT/TD-DFT study of solvent effect as well the substituents influence on the different features of TPP derivatives for PDT application.* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013, 104, 315-27.
3. P. Kuś, V. Kozik, M. Rojkiewicz, A. Sochanik, A. Szurko, M. Kempa, **P. Kozub**, M. Rams-Baron, K. Jarzembek, M. Stefaniak, J. Sakowicz: *The synthesis of new potential photosensitizers. Part 3. Tetraphenylporphyrin esters of profens.* Dyes and Pigments. 2015, 116, 46-51.
4. M. Kempa, **P. Kozub**, J. Kimball, M. Rojkiewicz, P. Kuś, Z. Gryczyński, A. Ratuszna: *Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy.* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2015, 146, 249–254.

Spis treści

Spis treści	6
WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	9
WPROWADZENIE	11
I. WSTĘP TEORETYCZNY	12
I. 1. Terapia fotodynamiczna.....	12
I. 1. 1. Fizyczne i chemiczne podstawy terapii.....	14
I. 1. 1. 1. Tlen singletowy	17
I. 1. 2. Fotouczulacze.....	19
I. 1. 2. 1. Klasyfikacja fotouczulaczy	20
I. 1. 3. Mechanizmy niszczenia komórek nowotworowych	26
I. 2. Nanotechnologie w PDT	28
I. 3. Liposomy.....	31
I. 3. 1. Wprowadzenie	31
I. 3. 2. Mechanizm powstawania liposomów	32
I. 3. 3. Projektowanie nośników liposomowych	33
I. 3. 3. 1. Skład błony liposomowej	33
I. 3. 3. 2. Hydrofilowa powłoka liposomów – efekt przestrzenny	34
I. 3. 3. 3. Rozmiar liposomów	34
I. 3. 3. 4. Płynność błony	35
I. 3. 3. 5. Techniki preparatyki.....	36
I. 3. 4. Rodzaje liposomów.....	38
I. 3. 5. Dostarczanie leków do komórek nowotworowych	39
I. 3. 6. Uwalnianie leków zamkniętych w liposomach.....	41
I. 3. 7. Zastosowanie liposomów.....	43
II. CEL I ZAKRES PRACY.....	47
III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	48
III. 1. Odczynniki stosowane w badaniach.....	48
III. 2. Badane fotouczulacze	49
III. 3. Preparatyka liposomów.....	50
III. 4. Komórki nowotworowe oraz warunki ich hodowli	52
III. 5. Metodyka badań	52
III. 5. 1. Fizykochemiczna charakterystyka fotouczulaczy	52

III. 5. 1. 1. Spektroskopia optyczna UV-VIS.....	52
III. 5. 1. 1. 1. Spektroskopia absorpcyjna	53
III. 5. 1. 1. 2. Spektroskopia emisyjna	54
III. 5. 1. 2. Kwantowa wydajność fluorescencji	54
III. 5. 1. 3. Czas życia fluorescencji	56
III. 5. 1. 4. Laserowa fotoliza błyskowa	57
III. 5. 1. 4. 1. Czas życia molekuł w stanie trypletowym.....	57
III. 5. 1. 4. 2. Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego ..	58
III. 5. 1. 5. Stabilność i fotodegradacja	59
III. 5. 2. Charakterystyka nośników liposomowych.....	60
III. 5. 2. 1. Rozmiar pęcherzyków fosfolipidowych	60
III. 5. 2. 2. Stabilność	61
III. 5. 2. 3. Efektywność zamykania leku	61
III. 5. 2. 4. Ocena przeżywalności komórek nowotworowych	62
IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW	66
IV. 1. Charakterystyka badanego fotouczulacza	66
IV. 1. 1. Widma absorpcji i molowy współczynnik absorpcji	66
IV. 1. 2. Widma emisyjne oraz ekscytacyjne	73
IV. 1. 3. Kwantowa wydajność fluorescencji	76
IV. 1. 4. Czas życia fluorescencji.....	79
IV. 1. 5. Czas życia molekuł w stanie trypletowym	82
IV. 1. 6. Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego	87
IV. 1. 7. Stabilność i fotodegradacja	90
IV. 2. Charakterystyka nośników liposomowych.....	94
IV. 2. 1. Średnica liposomów	94
IV. 2. 2. Stabilność liposomów	97
IV. 2. 3. Efektywność zamykania	102
IV. 2. 4. Test MTS.....	103
V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	116
VI. LITERATURA	121
VII. WYKAZ RYSUNKÓW	135
VIII. WYKAZ TABEL.....	137
IX. WYKAZ WYKRESÓW.....	139
ZAŁĄCZNIK 1	143

ZAŁĄCZNIK 2	145
ZAŁĄCZNIK 3	147

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

A549	Linia komórkowa ludzkiego raka płuc
BSA	Surowicza albumina wołowa (z ang. bovine serum albumin)
BDC	Linia komórek ludzkiego raka dróg żółciowych (z ang. bile duct cancer)
CCD-34Lu	Fibroblasty normalnych ludzkich komórek płuc
Chl <i>c</i>	Chloryna <i>c</i>
Chl <i>e</i>	Chloryna <i>e</i>
Chl <i>k</i>	Chloryna <i>k</i>
Chol	Cholesterol
CMC	Krytyczne stężenie micelizacji (z ang. critical micelle concentration)
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DMPC	Dimirystoilofosfatydylocholina
DMPG	Dimirystoilofosfatydyloglicerol
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DOPC	Dioleoilofosfatydylocholina
DOPE	Dioleoilofosfatydyloetanolamina
DOTAP	Dioleoilotrimetyloamoniopropan
DPPC	Dipalmitoilofosfatydylocholina
DPPG	Dipalmitoilofosfatydyloglicerol
DSPC	Distearoilofosfatydylocholina
DSPE-PEG 2000	Distearoilofosfatydyloetanolamina z glikolem polietylenowym
DSPG	Distearoilofosfatydyloglicerol
EPC	Fosfatydylocholina z jaj kurzych
EPG	Fosfatydyloglicerol z jaj kurzych
EPR	Zjawisko zwiększonej przenikalności i retencji (z ang. enhanced permeability and retention)
EtOH	Etanol
FILM	Technika mikroskopowego obrazowania czasów życia (z ang. fluorescence lifetime imaging microscopy)
FBS	Płodowa surowica bydlęca (z ang. foetal bovine serum)
FCS	Płodowa surowica cielęca (z ang. foetal calf serum)
FDA	Agencja Żywności i Leków (z ang. Food and Drug Administration)

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

GBC	Linia komórek ludzkiego raka pęcherzyka żółciowego (z ang. gall bladder cancer)
GM1	Monogangliozyd
HCT116	Komórki raka jelita grubego
HSPC	Fosfatydylocholina sojowa uwodorniona
IARC	Międzynarodowa Agencja do Badań Raka (z ang. International Agency for Research on Cancer)
IRF	Funkcja odpowiedzi układu na impuls (z ang. instrument response function)
LDL	Lipoproteina niskiej gęstości (z ang. low density lipoprotein)
LUV	Duże jednowarstwowe liposomy (z ang. large unilamellar vesicles)
MeOH	Metanol
MLL	Szczurzy rak prostaty
MLV	Liposomy wielowarstwowe (z ang. multilamellar vesicles)
MTS	3-(4,5-dimetylotiozol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol
PBS	Bufor fosforanowy
PDI	Współczynnik polidispersyjności (z ang. polydispersity index)
PDD	Diagnostyka fotodynamiczna (z ang. photodynamic diagnosis)
PDT	Terapia fotodynamiczna (z ang. photodynamic therapy)
PEG	Glikol polietylenowy (z ang. polyethylene glycol)
PI	Fosfatydyloinozytol
RES	System siateczkowo-śródbłonkowy (z ang. reticuloendothelial system)
ROS	Reaktywne formy tlenu (z ang. reactive oxygen species)
SUV	Małe jednowarstwowe liposomy (z ang. small unilamellar vesicles)
TCSPC	Technika zliczania pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo (z ang. time correlated single photon counting)
TPP	Mezo-tetrafenyloporfiryne
UV	Promieniowanie ultrafioletowe
VIS	Promieniowanie widzialne
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. World Health Organization)

WPROWADZENIE

Do chorób cywilizacyjnych o masowym zasięgu należą między innymi nowotwory. Międzynarodowa Agencja do Badań Raka IARC (z ang. International Agency for Research on Cancer) stanowiąca agendę Światowej Organizacji Zdrowia WHO (z ang. World Health Organization), szacuje, że w 2012 roku wystąpiło 28 rodzajów raka w 184 krajach na całym świecie. Ocenili, iż liczba nowych przypadków zachorowalności na raka wyniosła 14.1 mln, a liczba zgonów 8.2 mln. W porównaniu do danych statystycznych za 2008 rok liczba nowych przypadków wzrosła o 9.92%, natomiast zgonów o 7.31%. Do najczęściej zdiagnozowanych nowotworów na świecie zalicza się: rak płuc (1.8 mln; 13%), rak piersi (1.7 mln; 11.9%) oraz rak odbytu (1.4 mln, 9.7%). W nawiasach podano liczbę przypadków zachorowalności na dany typ raka oraz procent, jaki stanowią one w stosunku do wszystkich zdiagnozowanych przypadków. Najczęstszą natomiast przyczyną zgonów są nowotwory: płuc (1.6 mln; 19.4%), wątroby (0.8 mln; 9.1%) oraz żołądka (0.7 mln; 8.8%). Prognozowanie oparte na projekcie GLOBOCAN 2012 szacuje, że liczba nowych przypadków raka wzrośnie do 19.3 mln rocznie przed 2025 rokiem [1]. Na podstawie powyższych statystyk widać, iż niezmiernie ważnym zadaniem w dzisiejszych czasach jest uskutecznienie istniejących metod zwalczania nowotworów między innymi poprzez poszukiwanie nowych związków fotouczulających, które można by wykorzystać, jako leki w terapii fotodynamicznej. Ponadto, coraz większym zainteresowaniem cieszą się prace związane z użyciem w terapii nanonośnika w celu poprawy selektywności gromadzenia się fotouczulaczy w tkankach nowotworowych.

I. WSTĘP TEORETYCZNY

I. 1. Terapia fotodynamiczna

Terapia fotodynamiczna PDT (z ang. photodynamic therapy) jest mało inwazyjną techniką stosowaną do selektywnego niszczenia szkodliwych i niechcianych komórek bez uszkodzania zdrowych [2]. Wykorzystuje się ją do leczenia różnego typu nowotworów i nie tylko. Coraz częściej znajduje ona zastosowanie w dermatologii, okulistyce, czy też ginekologii [3-7]. Zaletą metody jest możliwość jej wielokrotnego stosowania, nawet dla tej samej zmiany chorobowej. Dodatkowo zastosowanie chemioterapii, radioterapii, czy też leczenia operacyjnego nie musi oznaczać wykluczenia terapii PDT. Często metody te wzajemnie się uzupełniają w celu uzyskania jak najlepszego efektu terapeutycznego [4, 8, 9].

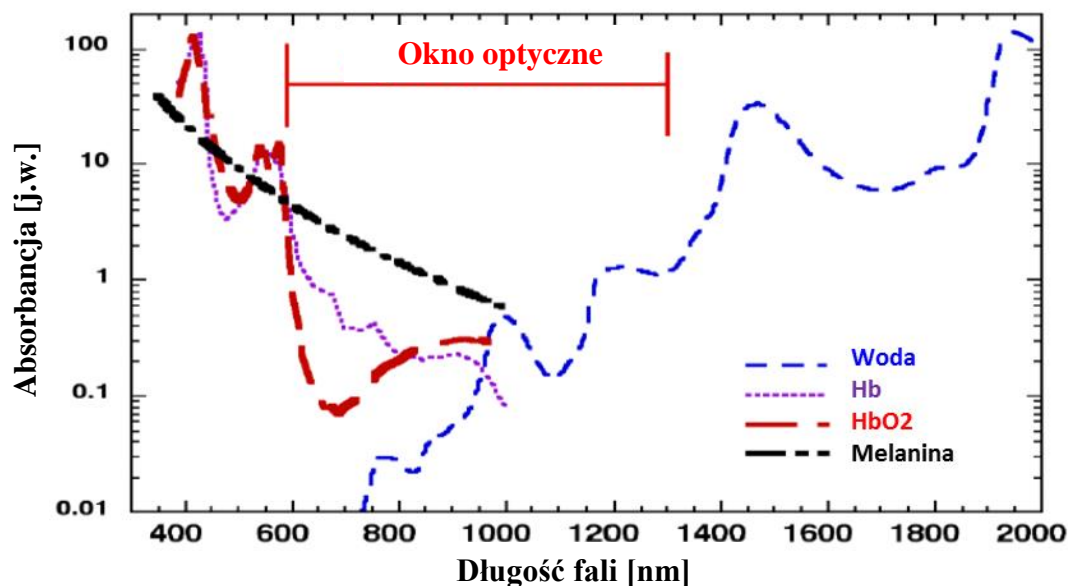
Podstawą terapii PDT jest obecność trzech składników: fotouczulacza – światłoczułego związku chemicznego, tlenu oraz światła o odpowiedniej długości fali. Osobno składniki te nie są toksyczne, dopiero ich połączenie zapoczątkowuje złożone procesy fizykochemiczne prowadzące do zniszczenia struktur komórkowych w obszarze zmian patologicznych [4, 5, 7, 9, 10]. Standardowa procedura terapii fotodynamicznej jest przedstawiona na rysunku 1. W pierwszej kolejności pacjentowi podaje się najczęściej poprzez wstrzyknięcie do krwioobiegu fotouczulacz, który po pewnym czasie gromadzi się selektywnie w komórkach nowotworowych [3, 4, 7, 11-13]. Czas akumulacji jest zależny od typu zastosowanego światłoczułego związku i może wynosić od 3 do 96 h [14, 15]. Następnie miejsce zmieniono chorobowo zostaje naświetlone światłem o odpowiedniej długości fali dopasowanej do danego fotouczulacza. Po zaabsorbowaniu światła przez molekuły fotouczulacza, w obecności tlenu, następują reakcje fotochemiczne prowadzące do zniszczenia komórek nowotworowych poprzez powstanie silnie utleniających reaktywnych form tlenu ROS (z ang. reactive oxygen species) oraz tlenu singletowego [3, 4, 11-13].



Rysunek 1: Schemat postępowania w terapii fotodynamicznej.

Terapia fotodynamiczna charakteryzuje się podwójną selektywnością. Jest ona związana z akumulacją fotouczulacza w większości w tkance nowotworowej oraz z ograniczeniem naświetlania tylko do miejsca zmienionego chorobowo. Selektywność gromadzenia się fotouczulaczy w guzie nowotworowym wynika z faktu, iż posiada on większą objętość śródmiąższową, większą liczbę makrofagów oraz receptorów białek o niskiej gęstości w stosunku do normalnych tkanek. Dodatkowo tkanka nowotworowa zaopatrywana jest w substancje odżywcze przez układ nieszczelnych naczyń krwionośnych i charakteryzuje się słabym drenażem limfatycznym. Wpływ na selektywne gromadzenie fotouczulaczy w miejscu zmienionym chorobowo ma również wysoka ilość nowo syntezowanego kolagenu oraz obniżone pH (około 5) [16-21]. W przypadku naświetlania miejsca zmienionego chorobowo światłem o długości fali dopasowanej do danego fotouczulacza dochodzi do jego wzbudzenia i powstania w wyniku szeregu reakcji fotochemicznych reaktywnych form tlenu oraz tlenu singletowego. W związku z tym, że czas życia oraz zasięg dyfuzyjny tych fotoproduktów jest niewielki, terapię fotodynamiczną można uznać za wysoce selektywny sposób niszczenia nowotworów, gdyż do zniszczeń struktur komórkowych dochodzi w miejscu wzbudzenia fotouczulacza [6].

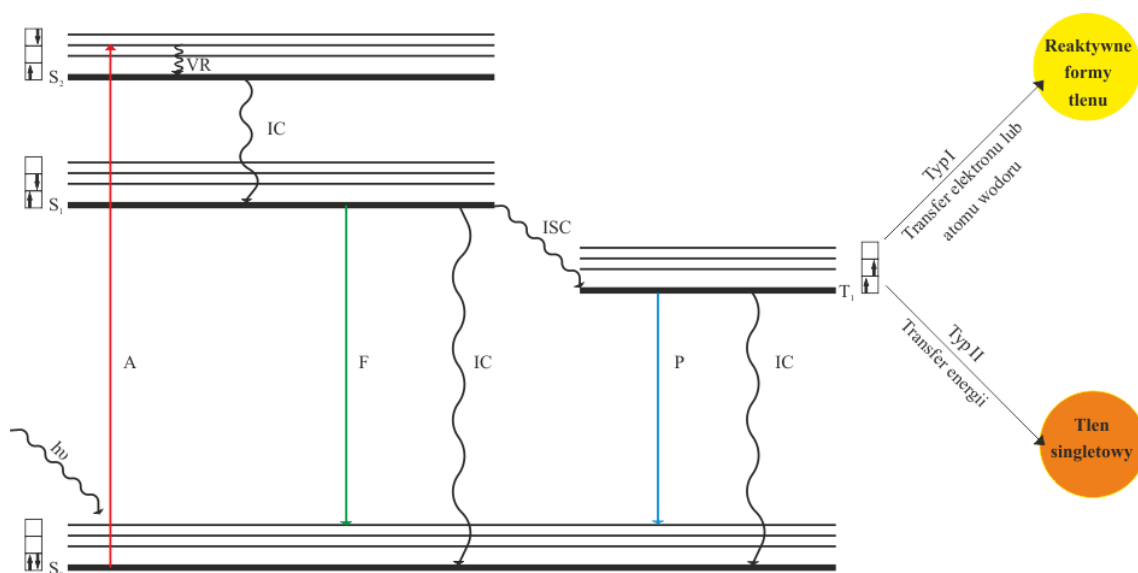
Wadą terapii fotodynamicznej jest jednak ograniczona głębokość penetracji tkanek przez światło wynosząca od 0.5 do 1.5 cm, co odpowiada długościom fal z zakresu 630 – 700 nm. Ludzkie tkanki najlepiej transmitują światło czerwone (>630 nm), jednakże możliwość wykorzystania fal dłuższych jest ograniczona przez chromofory naturalnie występujące w organizmie ludzkim, takie jak woda, oksyhemoglobina, deoksyhemoglobina, melanina czy też cytochromy. Na rysunku 2 widoczne są pasma absorpcji dla tych związków [3, 4, 22].



Rysunek 2: Okno optyczne tkanek; *Hb* – hemoglobina, *HbO2* – oksyhemoglobina [23].

I. 1. 1. Fizyczne i chemiczne podstawy terapii

Zasadę działania terapii fotodynamicznej można przedstawić graficznie za pomocą zmodyfikowanego schematu Jabłońskiego (Rysunek 3).



Rysunek 3: Schemat Jabłońskiego z uwzględnieniem procesów fotochemicznych zachodzących podczas terapii PDT. $h\nu$ – kwant świetlny pochłaniany przez cząsteczkę fotouczulacza; *A* – absorpcja; *FL* – fluorescencja; *P* – fosforescencja; *IC* – konwersja wewnętrzna; *ISC* – przejście międzysystemowe; *VR* – relaksacja wibracyjna [11, 24-27].

Cząsteczki fotouczulacza znajdują się w podstawowym stanie singletowym S_0 i posiadają dwa elektrony o przeciwnie skierowanych spinach (multipletowość równa 1). W wyniku absorpcji fotonów molekuly fotouczulacza przechodzą do jednego ze wzbudzonego stanu singletowego S_n ($n = 1, 2, 3, \dots, n$), w zależności od pochłoniętej energii. W trakcie tego przejścia całkowity spin elektronów równa się zero, a wartość multipletowości nie ulega zmianie. Wzbudzony stan singletowy charakteryzuje się krótkim czasem życia (nanosekundy) w wyniku, czego wzbudzona molekula może zostać dezaktywowana na kilka sposobów. W przypadku, gdy cząsteczka zostanie wzbudzona do jednego z wyższych stanów wzbudzonych S_n , może ona przejść do stanu S_1 za pomocą konwersji wewnętrznej (IC). Proces ten jest bezpromienisty, a zaabsorbowana energia przekształcana jest na ciepło. Jeżeli natomiast cząsteczka znajduje się na jednym z wyższych poziomów oscylacyjnych wzbudzonego stanu singletowego S_1 w pierwszej kolejności powróci ona do energetycznie najniższego poziomu tego stanu, a nadmiar energii zostanie rozproszony w postaci ciepła. Ten bezpromienisty proces nosi nazwę relaksacji wibracyjnej (VR). W następnej kolejności molekula może powrócić do stanu podstawowego poprzez rozproszenie ciepła (IC) lub emisję fotonu – fluorescencję (FL). FL jest przykładem przejścia promienistego i może zachodzić tylko z najniższego poziomu oscylacyjnego stanu S_1 . Istotny jest jednak fakt, że pasmo fluorescencji przesunięte jest w kierunku fal dłuższych w stosunku do pasma absorpcji ze względu na stratę pochłoniętej energii na inne przejścia bezpromieniste. Ostatnim sposobem powrotu wzbudzonej molekuly do stanu podstawowego jest bezpromieniste przejście międzysystemowe (ISC). W wyniku odwrócenia spinów cząsteczki mogą przejść ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 do wzbudzonego stanu trypletowego T_1 . W trakcie tego przejścia następuje zmiana multipletowości. Z punktu widzenia mechaniki kwantowej sytuacje tego typu są zabronione, jednak dzięki sprzężeniu spin-orbita istnieje pewne skończone prawdopodobieństwo ich wystąpienia. Molekula fotouczulacza z tego stanu może powrócić do stanu S_0 w wyniku przejścia bezpromienistego lub emisji fosforescencji (P). Oba tym przejściom towarzyszy ponowna zmiana spinu elektronów. Wzbudzony stan trypletowy jest stanem długożyjącym (mikro, a nawet milisekundy), dlatego konkurencją dla fotofizycznych procesów są fotochemiczne reakcje wzbudzonej molekuly fotouczulacza z innymi molekulami znajdującymi się w stanie trypletowym. Wyróżnia się dwa typy mechanizmów oddziaływania fotouczulacza z innymi molekulami w stanie trypletowym, mianowicie mechanizm typu I i typu II (Rysunek 4) [3, 7, 11, 13, 24, 27].

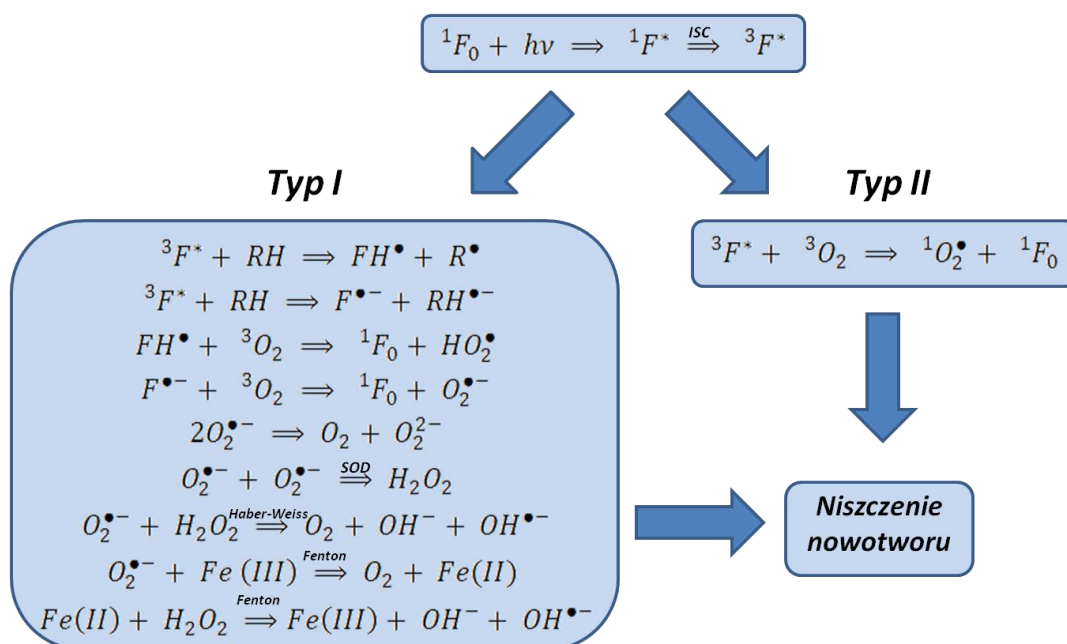
1) *Mechanizm typu I*

Wzbudzona molekula fotouczulacza może oddziaływać z substratem, którym w tym przypadku jest tkanka nowotworowa. Następuje między nimi przeniesienie elektronu lub wodoru, w wyniku czego powstają rodniki, które oddziałując z tlenem tworzą reaktywne formy tlenu. Często występującym produktem w tego typu reakcji fotochemicznej jest anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$). Nie jest on bardzo reaktywny w biologicznych systemach, ale może doprowadzić do powstania nadtlenu wodoru (H_2O_2), który z kolei łatwo może przechodzić przez błony biologiczne. W związku tym, iż uszkodzenia spowodowane H_2O_2 nie są ograniczone tylko do jednego komponentu komórki stanowi on istotny czynnik w ich niszczeniu. Dodatkowo, jeżeli stężenie nadtlenu wodoru jest wysokie może on oddziaływać z anionorodnikiem ponadtlenkowym i tworzyć silnie reaktywny rodnik hydroksylowy OH^\bullet (reakcja Habera-Weissa). Rodnik ten może utleniać wszystkie molekuly wewnątrz komórki i podobnie jak H_2O_2 może łatwo dyfundować do innych komponentów komórkowych. W obecności jonów metali takich jak żelazo, czy miedź rodnik hydroksylowy może być produkowany za pomocą reakcji Fentona [3, 6, 27].

2) *Mechanizm typu II*

Molekula fotouczulacza oddziałuje bezpośrednio z tlenem molekularnym, którego stanem podstawowym jest stan trypletowy (3O_2). Następuje przeniesienie energii z cząsteczki fotouczulacza na tlen w wyniku, czego powstaje silnie reaktywny tlen singletowy (1O_2). Tlen ten reaguje z wieloma biologicznymi molekułami takimi jak lipidy, proteiny, czy też kwasy nukleinowe prowadząc do śmierci komórek nowotworowych [3, 7, 21, 27].

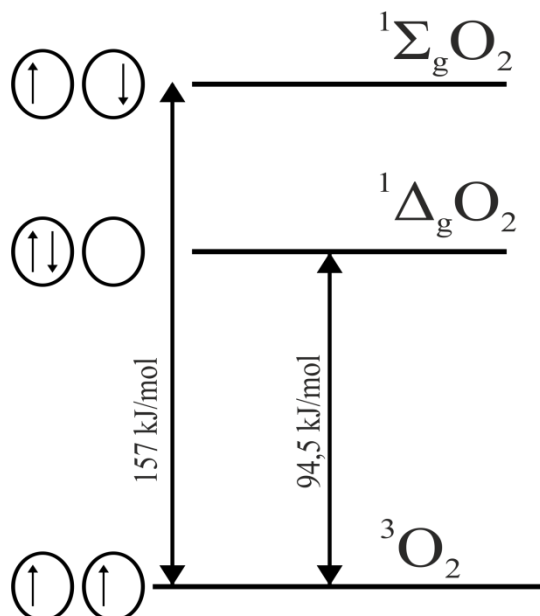
Oba mechanizmy zachodzą równocześnie i powodują uszkodzenia struktur biologicznych obecnych w ich sąsiedztwie w wyniku reakcji fotochemicznych. W zależności od typu zastosowanego fotouczulacza, jak również innych parametrów takich jak stężenie tlenu czy też substratu dominować będzie jeden z dwóch mechanizmów [7, 8, 11, 21].



Rysunek 4: Reakcje fotochemiczne zachodzące podczas przebiegu terapii fotodynamicznej. 1F_0 – fotouczulacz w podstawowym stanie singletowym; $h\nu$ – kwant świetlny pochłaniany przez cząsteczkę fotouczulacza; ${}^1F^*$ – fotouczulacz w singletowym stanie wzbudzonym; ${}^3F^*$ – fotouczulacz we wzbudzonym stanie trypletowym; ISC – przejście międzysystemowe; RH – substrat; FH^\bullet – rodnik fotouczulacza; R^\bullet – rodnik substratu; $F^{\bullet-}$ – anionorodnik fotouczulacza; $RH^{\bullet-}$ – anionorodnik substratu; 3O_2 – tlen molekularny w stanie trypletowym; HO_2^\bullet – rodnik wodorotlenkowy; $O_2^{\bullet-}$ – anionorodnik ponadtlenkowy; O_2 – tlen molekularny w stanie singletowym; O_2^{2-} – anion nadtlenu; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; H_2O_2 – nadtlenek wodoru [2, 3, 28].

I. 1. 1. 1. Tlen singletowy

W stanie podstawowym tlen molekularny posiada dwa niesparowane elektrony z równoległymi spinami na dwóch zdegenerowanych orbitalach antywiązących, co w rezultacie daje multipletowość równą 3 (Rysunek 5). W związku z powyższym nieaktywowany tlen znajduje się w stanie trypletowym. Tlen singletowy reprezentują natomiast wzbudzone stany singletowe: delta – ${}^1\Delta_g {}^1O_2$ i sigma – ${}^1\Sigma_g {}^1O_2$, charakteryzujące się dwoma sparowanymi elektronami na zewnętrznym orbitalu (Rysunek 5). W reakcji fotodynamicznego uszkodzania struktur biologicznych decydującą rolę odgrywa niższy wzbudzony stan singletowy ze względu na jego metastabilność. Tlen w tym stanie energetycznym charakteryzuje się dłuższym czasem życia i wykazuje silne właściwości utleniające [2, 3, 15].



Rysunek 5: Formy tlenu singletowego [28].

Pod kątem terapii fotodynamicznej fotouczulacz wzbudzany jest do stanu S_1 przy użyciu światła o energii równej w przybliżeniu 170 – 190 kJ/mol. Energia ta odpowiada długościom fal z zakresu 620 – 690 nm. Molekuły fotouczulacza po przejściu międzysystemowym, w stanie trypletowym posiadają energię około 110 – 130 kJ/mol. Energia przekazywana na tlen molekularny potrzebna do jego wzbudzenia do stanu singletowego wynosi około 94.5 kJ/mol (1270 nm). W związku z tym fotouczulacz w stanie trypletowym musi przekraczać tę energię. Przy uwzględnieniu strat termicznych występujących podczas fotofizycznych procesów górna granica długości fal stosowanych w terapii do wzbudzenia związku wynosi 850 nm [2, 3, 15].

Czas życia tlenu singletowego jest bardzo krótki. W zależności od środowiska może on wynosić od 3.5 μ s w wodzie do 100 μ s w rozpuszczalnikach organicznych, czy też w lipidach. Czas ten drastycznie spada w środowisku wewnątrzkomórkowym nawet do 0.2 μ s. Ze względu na krótki czas życia wysoce reaktywnego tlenu singletowego jego zasięg działania jest niewielki i wynosi od 10 do 55 nm. W związku z tym uszkodzenia w komórkach powstałe po terapii fotodynamicznej występują tylko w miejscach, gdzie został wzbudzony światłem fotouczulacz zgromadzony w tkankach [6, 10, 14, 17].

I. 1. 2. Fotouczulacze

Istotną rolę w skuteczności terapii fotodynamicznej odgrywają fotouczulacze, czyli związki światłoczułe, które ulegają aktywacji pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali. Obecnie ponad 30 związków zostało przebadanych w przedklinicznych próbach w celu wykorzystania ich, jako leki przeciwnowotworowe w terapii PDT. Ze względu jednak na to, iż wymagania stawiane fotouczulaczom są bardzo wysokie jedynie kilka z nich zostało zatwierdzonych przed Agencją Żywności i Leków FDA (z ang. Food and Drug Administration) do leczenia kilku typu nowotworów. W dalszym ciągu syntezowane są nowe związki, których właściwości fizykochemiczne powinny być zbliżone do idealnego fotouczulacza [29, 30]. Związek taki powinien charakteryzować się następującymi cechami fizycznymi, chemicznymi oraz biologicznymi [2, 3, 10-12, 14, 21, 22, 27, 30-35]:

- maksimum absorpcji nie powinno pokrywać się z maksimum absorpcji chromoforów naturalnie występujących w organizmie ludzkim;
- długość fali światła wzbudzającego powinna znajdować się w zakresie 600 – 850 nm, co zapewnia z jednej strony odpowiednią głębokość penetracji światła w głąb tkanki, a z drugiej strony energia stanu trypletowego jest wystarczająca do produkcji tlenu singletowego;
- silna absorpcja i wysoka wartość molowego współczynnika absorpcji przy długości fali wzbudzenia, co zapewnia zminimalizowanie dawki fotouczulacza potrzebnego do osiągnięcia odpowiedniego efektu terapeutycznego;
- wysoka wydajność przejścia międzysystemowego;
- czas życia w stanie trypletowym odpowiednio długi (rzędu mikrosekund), aby mogły wystąpić mechanizmy typu I i II w wyniku, których powstają ROS i tlen singletowy;
- wysoka wydajność generowania tlenu singletowego oraz reaktywnych form tlenu, które niszczą komórki nowotworowe;
- wykazywać fluorescencję w celu lokalizacji zmian chorobowych i oceny skuteczności terapii;
- amfifilowy charakter, dzięki czemu nie ulega on agregacji w środowisku wodnym oraz efektywnie wnika przez błonę lipidową do komórki;
- selektywnie gromadzić się w guzie nowotworowym;

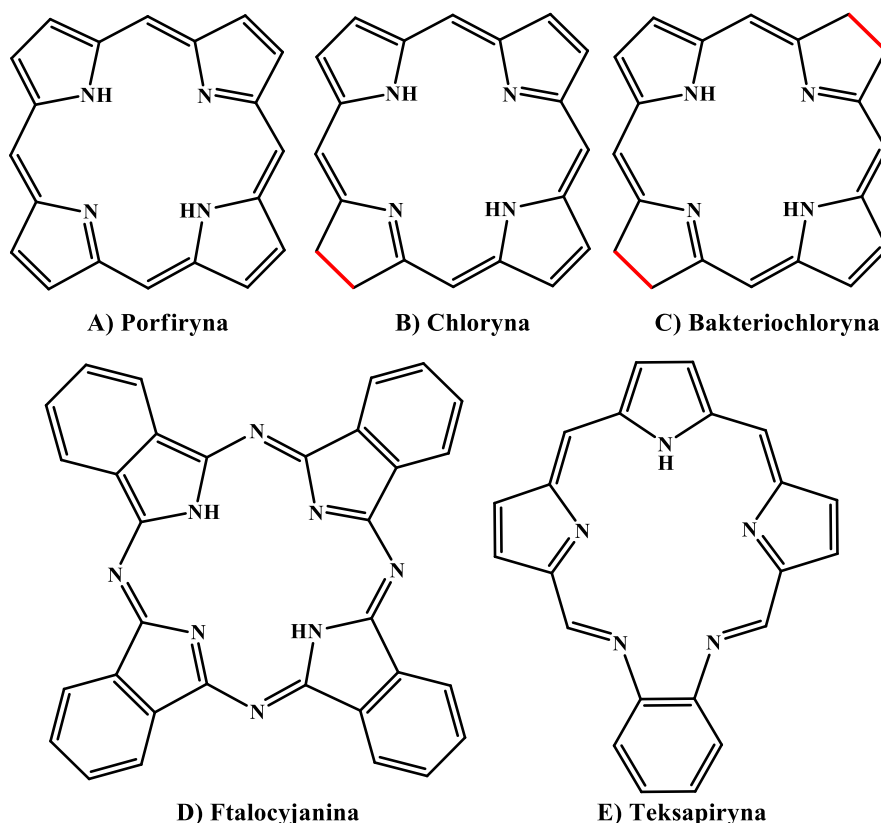
- czas akumulacji w miejscu docelowym powinien być stosunkowo krótki;
- szybko usuwany z organizmu by nie narażać pacjenta na długotrwałą nadwrażliwość na światło po terapii;
- stabilny chemicznie;
- nietoksyczny w ciemności.

Dodatkowo idealny fotouczulacz powinien posiadać szereg innych właściwości ważnych z punktu widzenia pacjenta oraz klinicznego zastosowania leku [3, 12, 22, 30]:

- bezbolesny dla pacjenta w trakcie i po terapii;
- nie powinien powodować żadnych reakcji alergicznych oraz efektów mutagennych w organizmie ludzkim;
- powinien być komercyjnie łatwo dostępny, a koszty produkcji niewysokie;
- łatwy w syntezowaniu;
- stabilny w transporcie.

I. 1. 2. 1. Klasyfikacja fotouczulaczy

Porfiry i ich pochodne takie jak chloryny czy bakteriochloryny należą do grup fotouczulaczy najczęściej badanych pod kątem ich wykorzystania w terapii fotodynamicznej (Rysunek 6). Związki te charakteryzują się silnym pasmem absorpcji w okolicy 400 nm (pasmo Soreta) oraz czterema z reguły mniej intensywnymi pasmami w zakresie od 500 do 800 nm (pasma Q). Pomimo wysokiej wartości molowego współczynnika absorpcji dla pasma Soreta, w terapii PDT wykorzystuje się ostatnie pasmo Q ze względu na głębszą penetrację tkanki przez światło [11, 27, 34, 36]. Wśród innych związków wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej do leczenia różnego typu nowotworów można wymienić ftalocjaniny oraz teksapiryny (Rysunek 6).



Rysunek 6: Struktury chemiczne fotouczulaczy [14].

Podstawowym elementem budowy porfiryn jest pierścień porfirynowy, który składa się z czterech cząsteczek pirolu połączonych mostkami metinowymi (Rysunek 6 A). Związki te charakteryzują się ostatnim pasmem absorpcji w okolicy 630 – 650 nm. Chloryny i bakteriochloryny posiadają natomiast zredukowane odpowiednio jedno lub dwa podwójne wiązania w pierścieniu porolowym (Rysunek 6 B i C). Redukcja tych wiązań powoduje przesunięcie batochromowe pasm Q. Dodatkowo wartości molowych współczynników absorpcji tych pasm są większe niż dla porfiryn. Z reguły chloryny posiadają ostatnie pasmo Q w okolicy 660 – 710 nm, a bakteriochloryny między 740 a 800 nm. Kolejną grupę fotouczulaczy stanowią ftalocyjaniny (Rysunek 6 D). Związki te w swojej budowie posiadają cztery izoindole połączone za pomocą atomów azotu do pierścienia porfirynowego. W centralnej części pierścienia znajduje się najczęściej atom cynku, krzemu lub aluminium, który zwiększa wydajność generowania tlenu singletowego. Ftalocyjaniny charakteryzują się ostatnim pasmem absorpcji w okolicy 670 – 700 nm. Ostatnią grupę omawianych fotouczulaczy stanowią teksapiryny (Rysunek 6 E) bazujące na tzw. rozszerzonej porfiryinie. Maksimum absorpcji ostatniego pasma obejmuje część spektralną w przedziale od 720 do 760 nm. Przesunięcie to jest możliwe dzięki wprowadzeniu jonów metali do zmodyfikowanej

strukturalnie porfiryny [7, 15, 34]. W tabeli 1 scharakteryzowano przykładowe fotouczulacze zatwierdzone do leczenia różnego typu raka jak i będące jeszcze w fazie prób klinicznych.

Tabela 1: Charakterystyka wybranych fotouczulaczy zatwierdzonych do leczenia różnych typów nowotworów oraz będących w fazie prób klinicznych [3, 8, 10, 11, 14, 21, 22, 29, 37, 38].

Grupa fotouczulaczy	Związek	Nazwa komercyjna	Długość fali wzbudzenia [nm]	Czas akumulacji	Okres nadwrażliwości na światło	Przykładowe zastosowanie
Porfiryne	Porfimer sodu	Photofrin	632	24 – 48 h	6 – 10 tygodni	Rak pęcherzyka moczowego (Kanada 1993), rak przełyku (Stany Zjednoczone 1995), rak płuc (Stany Zjednoczone 1998), przełyk Barretta (Stany Zjednoczone 2003)
Porfiryne	Kwas 5-aminolewulinowy (ALA)	Levulan	632	4 – 12 h	24 h	Rogowacenie słoneczne (Stany Zjednoczone 1999)
Porfiryne	Ester metylowy kwasu 5-aminolewulinowego (MAL)	Metvix	635	3 h	–	Rogowacenie słoneczne (Stany Zjednoczone 2004)
Porfiryne	Ester n-heksylowy kwasu 5-aminolewulinowego (HAL)	Cysview (Hexvix)	635	4 – 12 h	–	Diagnozowanie raka pęcherzyka moczowego (Stany Zjednoczone 2010)
Chloryne	Werteporfina BPD MA (z ang. benzoporphyrin derivative monoacid ring A)	Visudine (Verteporfin)	689	3 – 5 h	–	Zwyrodnienie plamki żółtej (Stany Zjednoczone 1999)
Chloryne	meso-tetra-(hydroksyfenylo)chloryne (m-THPC)	Foscan	652	24 – 96 h	4 – 6 tygodni	Rak głowy i szyi (Europa)

I. WSTĘP TEORETYCZNY

Chloryna	Etiopurpuryna cyny	Purlytin (SnET2, Rostaporfin)	664	24 h	2 tygodnie	Faza I/II: rak gruczołowy sutka, płaskonabłonkowy, mięsak Kaposiego Faza III: zwyrodnienie plamki żółtej
Chloryna	n-aspartylo-chloryna e6	Npe6, Talaporfin, Ls11	664	2 – 4 h	–	Leczenie raka płuc (Japonia 2003)
Chloryna	–	Laserphyrin, Litx	664	4 h	3 – 7 dni	Wczesne stadium raka płuc (Japonia 2003)
Teksapiryna	Teksapiryna lutetu	Lutrin Optrin Antrin	732	3 h	24 h	Faza I: rak prostaty Faza II: rak piersi i czerniak złośliwy Faza II: zwyrodnienie plamki żółtej Próby kliniczne w leczeniu chorób tętnic obwodowych oraz choroby wieńcowej
Ftalocyjanina	Tetrasulfonowana ftalocyjanina glinu	Photosens	676	24 – 72 h	kilka tygodni	Rak żołądka, skóry, wargi, jamy ustnej, piersi (Rosja)
Ftalocyjanina	Ftalocyjanina krzemowa (Pc4)	–	675	3 h	–	Faza I: rogowacenie słoneczne, choroba Bowena; rak skóry

Fotouczulacze porfiryne można podzielić na trzy generacje [22, 39]. Do pierwszej z nich zaliczane są pochodne hematoporfiryny, a wśród nich Photofrin – pierwszy fotouczulacz zatwierdzony przez FDA do wykorzystania w terapii fotodynamicznej. Jednakże ze względu na wady tego typu związków związane głównie ze słabą selektywnością gromadzenia się w miejscu docelowym, niskim molowym współczynnikiem absorpcji przy długości fali wzbudzenia (wymaga podania sporej ilości leku, by uzyskać odpowiedni efekt terapeutyczny) oraz długim okresem nadwrażliwości na światło trwające nawet do 10 tygodni po terapii, pojawiły się fotouczulacze zaliczane do drugiej generacji [14, 21, 28, 35, 39, 40]. Związki te charakteryzują się lepszymi parametrami fizycznymi, chemicznymi oraz biologicznymi w stosunku do fotouczulaczy I generacji. Wykazują one silną absorpcję przy długości fali wzbudzenia, a czas ich akumulacji w komórkach nowotworowych oraz okres fotowrażliwości są znacznie krótsze, w wyniku czego terapia może być przeprowadzona nawet w ciągu jednego dnia, co w dużym stopniu poprawia warunki życia pacjentów po PDT. Pomimo jednak tych zalet fotouczulacze II generacji są w większości hydrofobowe i mogą ulegać agregacji w środowisku wodnym powodując zmiany w ich właściwościach fizykochemicznych, czego skutkiem może być obniżenie efektywności terapii PDT. Dodatkowo związki te charakteryzują się słabą selektywnością gromadzenia w tkankach docelowych. W celu poprawy skuteczności terapii poprzez wzrost akumulacji światłoczułego związku w tkankach nowotworowych powstała trzecia generacja fotouczulaczy. W grupie tej związki z generacji I i II są zamykane w nanonośnikach takich jak: liposomy, micelle, nanocząstki złota czy też nanocząstki na bazie ceramiki. Prowadzone są również badania związane z przyłączaniem bezpośrednio do fotouczulacza różnego typu przeciwciał. Czynności te mają za zadanie zwiększyć selektywność dostarczania związków do miejsca zmienionego chorobowo [21, 22, 30, 39].

Istnieją również związki niebazujące na strukturze porfiryne, które wykazują aktywność fotodynamiczną. Aktualnie żaden z tych fotouczulaczy nie został jeszcze zatwierdzony przez FDA, znajdują się one na razie w fazie testów klinicznych [11, 14]. W tabeli 2 przedstawiono krótką charakterystykę tych związków.

Tabela 2: Charakterystyka wybranych fotouczulaczy nieporfirynowych [14, 37, 39].

Grupa fotouczulaczy	Związek	Długość fali wzbudzenia [nm]	Przykładowe zastosowanie
Antrachinony	Hiperycyna	590	Rak płaskonabłonkowy, rak podstawnokomórkowy, czerniak, mięsak Kaposiego
Fenotiazyny	Błękit metylenowy	666	Przewlekłe zapalenie przyzębia
Fenotiazyny	Błękit toluidynowy	630	Przewlekłe zapalenie przyzębia
Ksantyny	Róż bengalski	549	Rak sutka, czerniak
Ksantyny	TH9402	514	Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
Cyjaniny	Merocyjanina 540	556	Białaczka, chłoniak
Kurkuminoidy	Kurkumina	420	Doustny środek dezynfekujący

I. 1. 3. Mechanizmy niszczenia komórek nowotworowych

Przeciwnowotworowe działanie terapii fotodynamicznej związane jest ze złożonymi mechanizmami prowadzącymi do zniszczenia komórek nowotworowych w sposób bezpośredni lub pośredni. W pierwszym przypadku do śmierci komórek dochodzi na drodze nekrozy, apoptozy lub autofagii. Natomiast do pośrednich metod działania terapii zalicza się uszkodzenia naczyń krwionośnych dostarczających substancje odżywcze komórkom guza oraz odpowiedź układu immunologicznego [8, 13, 16]. Istnieje wiele czynników decydujących o tym, który z mechanizmów śmierci komórki zostanie zainicjowany. Do głównych parametrów wpływających na rodzaj śmierci komórek w PDT zalicza się między innymi: stężenie fotouczulacza, fizykochemiczne właściwości oraz subkomórkowa lokalizacja fotouczulacza, długość fali użytej do jego wzbudzenia, dawkę światła, typ nowotworu i jego unaczynienie, czas jaki upływa od momentu podania leku do naświetlenia zmiany chorobowej oraz od stężenia tlenu w tym miejscu [8, 13, 21, 41, 42]. Dodatkowo wszystkie te mechanizmy mogą wpływać wzajemnie na siebie, dzięki czemu istnieje możliwość powstania długotrwałego efektu przeciwnowotworowego po zastosowaniu PDT [8, 13, 16, 21, 43]. Ze względu jednak na krótki czas życia oraz ograniczony zasięg działania reaktywnych form tlenu i tlenu singletowego bezpośrednie uszkodzenia komórek po terapii

fotodynamicznej występują w odległości do kilku nanometrów od miejsca zgromadzenia fotouczulacza w komórce.

Z licznych obserwacji wynika, że lokalizacja fotouczulaczy w organelach komórkowych wpływa na rodzaj śmierci komórkowej. Dla związku zgromadzonego w mitochondriach oraz w siateczce śródplazmatycznej następuje śmierć na drodze apoptozy, podczas gdy fotouczulacz znajdujący się w błonie komórkowej oraz lizosomach może blokować mechanizm apoptozy inicjując proces nekrozy [8, 37, 42]. Ponadto uważa się, iż przy zastosowaniu wysokich stężeń fotouczulacza oraz dużych dawek światła, nekroza jest przeważającym mechanizmem śmierci komórek. Apoptoza natomiast dominuje przy nierozległym efekcie terapeutycznym uzyskanym dzięki zastosowaniu niskiego stężenia związku oraz niskiej dawki światła [8, 13, 41, 44]. Wydaje się również, że niedobór glukozy sprzyja wystąpieniu nekrozy, gdyż apoptoza jest procesem energochłonnym [16]. Poniżej przedstawiono krótki opis poszczególnych mechanizmów prowadzących do śmierci komórek nowotworowych:

- 1) *Nekroza* – zwana inaczej martwicą jest gwałtownym i szybkim procesem prowadzącym do śmierci komórek w wyniku uszkodzenia fizycznego lub chemicznego. Proces ten *in vitro* charakteryzuje się pęcznieniem cytoplazmy oraz rozerwaniem błony komórkowej, co prowadzi do uwolnienia zawartości wewnątrzkomórkowej i powstania stanu zapalnego groźnego dla organizmu. Często nekroza określana jest również, jako przypadkowa śmierć komórki przebiegająca w sposób niezaprogramowany [13, 21, 41, 42, 44].
- 2) *Apoptoza* – proces ten nazywany jest programowaną śmiercią komórki. Może ona być zainicjowana przez aktywację receptorów śmierci albo przez mitochondrialne uwolnienie cytochromu *c*. Oba te szlaki mogą doprowadzić do uruchomienia kaskady kaspaz takich jak kaspaza -3, -6 i -7, które rozszczepiają substraty komórkowe, prowadząc do charakterystycznych zmian biochemicznych i morfologicznych w umierających komórkach [32, 42, 44, 45]. W badaniach *in vitro* komórki apoptotyczne są często podzielone na kilka zamkniętych pęcherzyków otoczonych błoną, które *in vivo* są pochłaniane przez fagocyty. W odróżnieniu od nekrozy w procesie apoptozy nie występuje stan zapalny [8, 13, 41, 46].
- 3) *Autofagia* – jest mechanizmem pozwalającym utrzymać równowagę pomiędzy syntezą, degradacją oraz recyklingiem produktów komórkowych. Istnieje wiele procesów autofagii jednakże wszystkie związane są z lizosomową degradacją

organelli komórkowych oraz białek. Ogólnie autofagia polega na pochłonięciu i strawieniu przez komórkę elementów jej struktury. Struktura błonowa otacza docelowy region tworząc pęcherzyk zwany autofagosomem, oddzielający zamkniętą zawartość od pozostałej części cytoplazmy. W następnej kolejności jest on transportowany i ulega fuzji z lizosomem tworząc strukturę, której zawartość jest rozkładana przez hydrolazy lizosomalne. Autofagia oprócz usuwania niechcianych białek, organelli oraz mikroorganizmów pozwala także przetrwać komórce w warunkach niedoboru składników odżywczych [8, 42, 46, 47].

- 4) *Efekty naczyniowe* – przeżywalność komórek guza zależy od ilości substancji odżywczych dostarczanych przez naczynia krwionośne. Natomiast rozrost oraz konserwacja powstałej sieci naczyń krwionośnych związana jest z czynnikiem wzrostu produkowanym między innymi przez komórki nowotworowe. Podczas terapii fotodynamicznej może nastąpić uszkodzenie naczyń w wyniku powstania reaktywnych form tlenu oraz tlenu singletowego, które mogą prowadzić do powstania zakrzepicy oraz krwawienia. W efekcie końcowym guz nowotworowy umiera na skutek zamknięcia naczyń krwionośnych, gdyż zostaje on pozbawiony tlenu oraz substancji odżywczych [8, 13, 38, 44, 48].
- 5) *Odpowiedź układu immunologicznego* – po terapii fotodynamicznej komórki nowotworowe, które nie zginęły w wyniku wyżej opisanych mechanizmów śmierci mogą, zostać zniszczone przez komórki układu odpornościowego. Mianowicie powstałe po terapii uszkodzenia komórek nie zawsze muszą być dla nich śmiertelne i mogą prowadzić do wytworzenia miejscowego stanu zapalnego [48]. W rezultacie w odpowiedzi na stres dochodzi do uwolnienia cytokin i białek, które przyczyniają się do napływu leukocytów odpowiedzialnych nie tylko za zniszczenie guza, ale również za stymulację odpowiedzi układu odpornościowego do rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych [13, 21, 38, 43, 49].

I. 2. Nanotechnologie w PDT

Celem wykorzystania nanotechnologii w medycynie jest ulepszenie oraz zwiększenie skuteczności tradycyjnych metod leczenia. Oferuje ona szereg nowych

rozwiązań gwarantujących między innymi wzrost selektywności dostarczanych leków w miejscach zmienionych chorobowo [18, 50].

Ograniczenia w terapii fotodynamicznej związane są z niewystarczającą selektywnością gromadzenia się fotouczulacza w tkance nowotworowej. Poza tkanką docelową akumuluje się on również w skórze i oczach. Stężenia w tych miejscach nie są wysokie, ale wystarczające by wywołać fototoksyczne reakcje niebezpieczne dla pacjenta nawet kilkadziesiąt dni po zakończeniu leczenia. W związku z tym wydłuża się okres rekonwalescencji pacjenta po terapii, która wymaga całkowitej zmiany trybu życia. Pacjent po leczeniu PDT musi przebywać w pomieszczeniach zaciemnionych, niewskazane jest również oglądanie telewizji. Dopuszczalne jest natomiast używanie żarówek o bardzo małej mocy. Często bywa tak, że okres po terapii jest bardziej uciążliwy i niebezpieczny dla pacjenta niż sama terapia [50].

Aktualnie zatwierdzone do badań klinicznych fotouczulacze I i II generacji nie posiadają cech idealnego fotouczulacza. Większość z nich jest hydrofobowa i ulega agregacji w środowisku wodnym, przez co fotouczulacze nie są w stanie silnie absorbować światła i w konsekwencji obniża się ich zdolność do wydajnego generowania reaktywnych form tlenu i tlenu singletowego, które niszczą komórki nowotworowe. Związki te w dalszym ciągu wykazują niską selektywność akumulacji w chorych tkankach oraz długi czas retencji w organizmie pacjenta [39, 51, 52].

W celu poprawy efektywności terapii fotodynamicznej można wykorzystać nanocząstki, jako potencjalne nośniki leków, które będą selektywnie dostarczać fotouczulacz do miejsca docelowego w ilościach wystarczających do uzyskania odpowiedniego efektu terapeutycznego. Dodatkowo takie nośniki ułatwiają transport hydrofobowych leków w krwioobiegu [39, 50, 51, 53-55]. Jednakże nanocząstki wykorzystywane do transportu leków muszą posiadać szereg odpowiednich właściwości fizykochemicznych. Taki idealny nośnik powinien być biodegradowalny, nietoksyczny, posiadać minimalną immunogenność, wykazywać wysoką efektywność zamykania leku, zapobiegać agregacji, która w istotny sposób obniża skuteczność leku. Ważne jest również, aby sam nośnik nie wpływał na obniżenie aktywności fotouczulacza [21, 39, 50, 51, 53]. Oprócz pasywnego dostarczania leków za pomocą nanonośników istnieje również możliwość aktywnego celowania nanocząstek do komórek nowotworowych. Do tego celu wykorzystuje się różnego typu ligandy, które pozwalają ukierunkować nanonośniki do specyficznych komórek nowotworowych posiadających nadekspresję na konkretne receptory [20, 21, 39, 53]. Dodatkowo istnieje możliwość zaprojektowania

nanonośnika, który oprócz selektywnego dostarczenia leku do miejsca docelowego może również uwolnić zamknięty w nim związek na skutek zadziałania odpowiedniego czynnika zewnętrznego. Przykładowo nanocząstki mogą być wrażliwe na konkretną wartość temperatury lub pH, przy której ulegają destabilizacji i uwalniają zamknięty w nich lek [18, 55, 56].

Obecnie prowadzone są badania nad wykorzystaniem różnego typu nanocząstek, jako nośników leków przeciwnowotworowych. Wśród nich można wyróżnić [18, 21, 39, 53, 54, 57-60]:

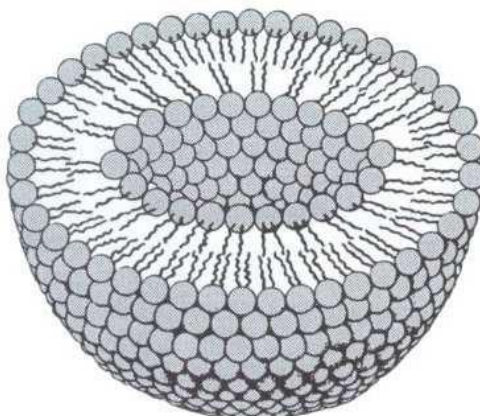
- liposomy;
- polimerowe micle;
- nanocząstki na bazie ceramiki;
- nanocząstki polimerowe;
- dendrymery;
- nanocząstki metali;
- nanocząstki złota;
- nanodiamanty.

Właściwości powyższych nanocząstek są bardzo zróżnicowane. Przed wyborem odpowiedniego nośnika do badań należy, zatem określić rodzaj transoprotowanego leku. Istotny jest fakt, czy związek jest hydrofobowy, czy też hydrofilowy. W następnej kolejności należy wziąć pod uwagę miejsce, do którego lek ma być dostarczony. Niektóre nanocząstki posiadają możliwość przyłączania do nich różnego typu ligandów, które zwiększają selektywność dostarczania do miejsca docelowego. Dodatkowym parametrem decydującym o wyborze danego nośnika jest rozmiar, który warunkuje sposób ich podania pacjentowi. Do innych czynników wpływających na wykorzystanie poszczególnych typów nanocząstek należą między innymi koszty ich produkcji oraz stabilność w krwioobiegu.

I. 3. Liposomy

I. 3. 1. Wprowadzenie

Liposomy zostały odkryte w latach 60 XX wieku przez brytyjskiego hematologa Alec D. Banghman. Są to małe pęcherzyki o sferycznym kształcie zbudowane z jednej lub kilku dwuwarstw fosfolipidowych oddzielonych od siebie przestrzeniami wodnymi (Rysunek 7) [61-63].

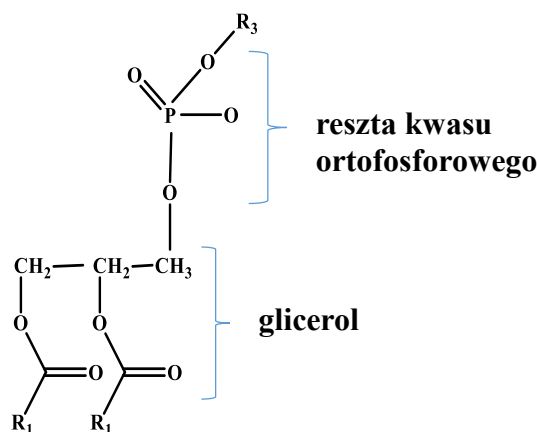


Rysunek 7: Struktura liposomu zbudowanego z jednej dwuwarstwy fosfolipidowej otaczającej rdzeń wodny [64].

Pęcherzyki fosfolipidowe są wykorzystywane jako biodegradowalne i biokompatybilne nośniki różnego typu leków, które mogą być zamykane w dwuwarstwie fosfolipidowej – związki hydrofobowe lub w przestrzeni wodnej – hydrofilowe. Zastosowanie liposomów pozwala zredukować toksyczność terapeutyków w nich zamkniętych, zwiększyć ich efektywność poprzez zapobieganie agregacji w środowisku wodnym oraz ograniczyć gromadzenie się w zdrowych tkankach [55, 61, 63, 65-71]. Dodatkowo chronią one zamknięte w nich substancje przed zbyt wczesnym usunięciem z organizmu. Mogą również przedłużać czas przebywania leku w krwioobiegu poprzez ich wolne uwalnianie z liposomu. Kolejną zaletą tego typu nośników jest łatwa modyfikacja ich rozmiaru, ładunku oraz składu błony fosfolipidowej, dzięki czemu można zwiększyć selektywność dostarczania leku do miejsca docelowego [55, 67, 68, 72, 73].

I. 3. 2. Mechanizm powstawania liposomów

W zrozumieniu jak powstają liposomy istotny jest fakt, że zbudowane są one z fosfolipidów, które są związkami amfifilowymi. Posiadają one w swojej strukturze region hydrofobowy (ogon) oraz hydrofilowy (głowa). Ogon hydrofobowy zbudowany jest z dwóch łańcuchów kwasów tłuszczowych zawierających od 10 do 24 atomów węgla oraz od 0 do 6 podwójnych wiązań w każdym łańcuchu [64, 74]. Za pomocą glicerolu łańcuchy przyłączone są do części polarnej, którą głównie stanowi reszta kwasu ortofosforowego związana z inną molekułą rozpuszczalną w wodzie [75]. Na rysunku 8 przedstawiono ogólną strukturę fosfolipidów.



Rysunek 8: Ogólna struktura fosfolipidów. R_1 ; R_2 – łańcuchy kwasów tłuszczowych; R_3 – grupa hydrofilowa [65].

W środowisku wodnym z fosfolipidów spontanicznie formułuje się dwuwarstwowa struktura, w której hydrofilowe głowy stanowią zewnętrzną warstwę [63, 74]. Następnie powstałe dwuwarstwy zaginają się w celu ograniczenia niekorzystnych interakcji pomiędzy roztworem wodnym a łańcuchami kwasów tłuszczowych. W efekcie końcowym zakrzywienie dwuwarstw prowadzi do powstania dużego wielowarstwowego pęcherzyka [76]. Charakteryzuje się on stanem o najniższej energii i jest metastabilny. Jednakże fosfolipidy są zdolne do formułowania różnych makroskopowych struktur mniej lub bardziej stabilnych. Związane jest to z wartością krytycznego stężenia micelizacji CMC (z ang. critical micelle concentration), która dla fosfolipidów wynosi od 10^{-8} do 10^{-12} M w zależności od długości łańcuchów kwasów tłuszczowych. CMC definiowana jest, jako koncentracja lipidów w roztworze powyżej, której tworzą one agregaty o uporządkowanej strukturze takie jak micelle, odwrócone micelle, układy

tubularne lub liposomy [66, 75, 77, 78]. Na powstawanie różnych struktur ma również wpływ kształt cząsteczki amfifilów. W przypadku, gdy powierzchnia przekroju części polarnej (A_p) jest większa od powierzchni przekroju części hydrofobowej (A_{np}) powstają struktury o wysokiej krzywiźnie, jak na przykład micelle. Gdy $A_p < A_{np}$ preferowane są formy odwróconych miceli, natomiast kiedy powierzchnie przekroju obu części są porównywalne powstają struktury dwuwarstwowe [75, 79].

I. 3. 3. Projektowanie nośników liposomowych

Końcowe właściwości fizykochemiczne nośnika liposomowego zależą od wielu czynników takich jak np. temperatura uwodnienia, typ fosfolipidów użytych do preparatyki, natura zamykanego leku, technika redukcji rozmiaru pęcherzyków. Wszystkie te zmienne mogą w sposób bezpośredni lub pośredni wpłynąć na formowanie się liposomów. Ważne jest, aby podczas tworzenia liposomów czynniki te były zoptymalizowane w celu uzyskania możliwie jak najlepszej formułacji liposomowej z maksymalną stabilnością oraz wysoką wydajnością zamykania leku. W związku z powyższym projektowanie nośnika liposomowego należy rozpocząć od określenia zadania, do którego zostanie on wykorzystany, a następnie wybrać skład błony liposomowej oraz technikę preparatyki [65, 74, 77, 80-82].

I. 3. 3. 1. Skład błony liposomowej

W zależności od wartości ładunku głowy hydrofilowej fosfolipidy możemy podzielić na neutralne, anionowe oraz kationowe. Zarówno wartość ładunku, jak i jego gęstość na powierzchni liposomu wpływa na jego stabilność, biodystrybucję oraz pobór przez docelowe komórki [65, 77]. Liposomy neutralne wykazują niższą tendencję do usuwania przez komórki systemu siateczkowo-śródbłonkowego RES (z ang. reticuloendothelial system) oraz wyższą zdolność do agregacji po podaniu ogólnoustrojowym w porównaniu do pozostałych liposomów. Liposomy anionowe charakteryzują się zwiększoną stabilnością w zawiesinie, a stopień agregacji ulega redukcji. Dodatkowo użycie niektórych glikolipidów jak na przykład monogangliozydu GM1, czy fosfatydyloinozytolu PI, hamuje wychwyt liposomów przez makrofagi

i komórki RES, przez co wydłuża się ich czas krążenia w krwioobiegu nawet do 12 h [70, 83, 84]. Liposomy kationowe są natomiast często wykorzystywane, jako system wewnątrzkomórkowego dostarczania DNA w terapii genowej. Posiadają one wysoką zdolność interakcji z białkami surowicy, co skutkuje ich zwiększonym wychwytem przez RES. Są one również proponowane, jako system dostarczania składników do komórek poprzez ich fuzję z błoną komórkową [65, 80, 85, 86].

I. 3. 3. 2. Hydrofilowa powłoka liposomów – efekt przestrzenny

Modyfikacja powierzchni liposomu poprzez włączenie do składu błony niewielkich frakcji związków posiadających grupy hydrofilowe może zredukować ich interakcje z komórkami oraz komponentami krwi i zapobiec ich wykryciu przez system RES [65, 68, 80]. Dodatkowo liposomy tego typu są bardziej stabilne w środowisku biologicznym i mogą wykazywać prawie 10-krotnie dłuższy czas półtrwania w krwioobiegu [65, 80]. Najczęściej do uzyskania hydrofilowej powłoki wokół liposomów wykorzystuje się fosfatydyloetanolaminę sprzężoną z hydrofilowym polimerem – glikolem polietylenowym PEG (z ang. polyethylene glycol) [70]. Liczne badania pozwoliły określić, iż niewielkie stężenie (5 – 10 mol%) tego lipidu w błonie liposomowej zapobiega ich rozpoznaniu przez makrofagi oraz komórki systemu siateczkowo-śródbłonkowego. W zależności od długości polimeru tworzy on wokół liposomu dodatkową warstwę o grubości 5 nm niewpływającą na całkowitą wartość ładunku na powierzchni pęcherzyków. Najdłuższym czasem krążenia w krwioobiegu charakteryzują się liposomy zawierające glikol polietylenowy o masie 2000 Da [65, 71, 75, 84, 87]. Do innych amfifilowych polimerów przyłączanych do powierzchni liposomów w celu zapewnienia im hydrofilowej powłoki zalicza się między innymi: poli(-akryloilo)-morfoliny, poliakrylamid oraz poliwinylpirolidon. Jednakże mogą to być związki szkodliwe dla człowieka [65].

I. 3. 3. 3. Rozmiar liposomów

Średnica pęcherzyków fosfolipidowych jest jednym z głównych parametrów decydujących o ich dystrybucji oraz usuwaniu z organizmu [67, 88]. W zależności od ich

rozmiaru są one mniej lub bardziej wychwytywane przez makrofagi oraz komórki systemu siateczkowo-śródbłonkowego. Wczesne badania pokazały, iż pobór pęcherzyków przez RES oraz ich opsonizacja przez białka osocza wzrasta wraz z ich średnicą. Redukcja rozmiaru powoduje natomiast wzrost ich akumulacji w tkankach nowotworowych. Efekt ten może być związany z dłuższym czasem krążenia w krwioobiegu mniejszych liposomów oraz faktem, iż nowotwory zaopatrywane są przez nieszczelne naczynia krwionośne, co również ułatwia akumulację małych liposomów w tkankach docelowych [65, 80, 84].

I. 3. 3. 4. Płynność błony

Fosfolipidy posiadają charakterystyczną temperaturę przejścia fazowego T_c , powyżej której błona liposomowa jest w fazie żelowej, a poniżej w fazie płynnej. W fazie żelowej dwuwarstwa fosfolipidowa jest sztywna i dobrze zorganizowana, a ruchliwość cząstek ograniczona. Natomiast w fazie płynnej jest ona nieuporządkowana i charakteryzuje się wyciekami zamkniętej w liposomie substancji. Płynność błony liposomowej można modyfikować używając do jej budowy fosfolipidów o różnej temperaturze przejścia fazowego. W zależności od długości łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz tego, czy są one nasycone, czy też nie temperatura T_c może wynosić od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ [65, 80].

Przepuszczalność błony liposomowej jest cechą wysoce niepożądaną, ponieważ zbyt wczesne uwolnienie leku zmniejsza jego efektywność terapeutyczną w miejscu docelowym. Dodatkowo liposomy poniżej temperatury przejścia fazowego mogą ulegać agregacji [65, 76, 80]. Dodanie do składu błony liposomowej niewielkich ilości cholesterolu zwiększa jej przepuszczalność, a powyżej stężenia 30 mol% może podnieść temperaturę przejścia fazowego lub ją całkowicie wyeliminować. Cholesterol jest molekułą amfifilową, która wbudowując się w błonę liposomową posiada grupy hydroksylowe zorientowane w kierunku fazy wodnej, a alifatyczny łańcuch ustawiony jest równolegle do łańcuchów kwasów tłuszczowych [64, 68, 77, 80].

Z punktu widzenia zastosowania liposomów, jako nośników leków podczas ich projektowania należy uwzględnić temperaturę panującą w miejscu docelowym. W warunkach fizjologicznych liposomy zbudowane z fosfolipidów o wysokiej temperaturze przejścia fazowego ($T_c > 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) będą charakteryzowała się słabszą

przepuszczalnością dwuwarstwy dla zamkniętych w nich leków, natomiast przy niskiej temperaturze ($T_c < 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) będą uwalniać transportowany związek [65, 76, 80].

I. 3. 3. 5. Techniki preparatyki

Wybór metody preparatyki liposomów zależy od sposobu wykorzystania otrzymanych pęcherzyków. W zależności od zastosowanej techniki można uzyskać liposomy wielowarstwowe MLV (z ang. multilamellar vesicles) lub jednowarstwowe duże LUV (z ang. large unilamellar vesicles) oraz małe SUV (z ang. small unilamellar vesicles). Powyższe liposomy charakteryzują się różną efektywnością zamykania leków w przestrzeni wodnej oraz w dwuwarstwie. Istotny jest bowiem fakt, czy zamykany w nich związek ma charakter hydrofilowy czy hydrofobowy. Dodatkowo koncentracja leku potrzebna do uzyskania odpowiedniego efektu terapeutycznego w miejscu docelowym również decyduje o wyborze techniki preparatyki [62, 63, 76, 80].

Najprostszą i najczęściej używaną techniką preparatyki MLV jest hydratacja cienkiego filmu fosfolipidowego. W metodzie tej film uwadniany jest buforem wodnym w temperaturze powyżej przejścia fazowego. Hydrofilowy lek zamykany w przestrzeni wodnej rozpuszczony jest w buforze wykorzystywanym do hydratacji filmu. Natomiast leki hydrofobowe dodawane są do roztworu lipidów przed odparowaniem rozpuszczalnika organicznego, którym najczęściej jest chloroform i utworzeniem suchego filmu, dzięki czemu są one zlokalizowane w dwuwarstwie fosfolipidowej. Przy zastosowaniu tej metody uzyskuje się heterogeniczną populację liposomów wielowarstwowych o średnicy od 0.1 μm do 10 μm . Wadą tej metody jest słaba efektywność zamykania leków hydrofilowych (5 – 15%) [66, 68, 80, 88, 89]. Dodatkowo redukcja ich rozmiaru zmniejsza ilość leku w nich zamkniętego.

Duże liposomy jednowarstwowe są to pęcherzyki o średnicy od 100 nm do 1000 nm [68, 69]. Można je uzyskać poprzez ekstruzję (przetłaczanie) MLV przez poliwęglanowe filtry membranowe o określonej średnicy porów. Do tego celu wykorzystuje się kalibrator, urządzenie z angielskiego nazywane ekstruderem. Liposomy przeciska się przez filtry dzięki ciśnieniu gazu podłączonego do kalibratora. W efekcie końcowym uzyskane pęcherzyki fosfolipidowe charakteryzują się niewielkim rozrzutem wielkości. Dodatkowo metoda ta jest szybka, tania i pozwala otrzymać jednorodną zawiesinę LUV przy każdym jej zastosowaniu. Wykorzystując filtry o odpowiedniej

wielkości porów można również uzyskać małe liposomy jednowarstwowe [69, 76, 88]. SUV można także otrzymać w wyniku działania ultradźwięków na zawiesinę MLV oraz LUV. W zależności od objętości próbki wykorzystuje się sonikatory wannowe lub zanurzeniowe [68, 88]. Zawiesinę poddaje się działaniu ultradźwięków przez około 5 – 10 minut w temperaturze powyżej przejścia fazowego, w wyniku czego uzyskuje się liposomy o średnicy < 50 nm. Wykorzystując tę technikę należy uważać, aby ultradźwięki nie uszkodziły struktury leku zamkniętego w liposomach [62, 63, 66, 76, 80, 88, 90]. Główną wadą tej metody jest to, iż uzyskana zawiesina nie jest jednorodna, mogą w niej występować zarówno SUV jak i MLV. Dodatkowo otrzymane pęcherzyki wykazują niską efektywność zamykania leków [67, 88, 89].

Do innych metod preparatyki liposomów można zaliczyć między innymi:

- odparowywanie techniką faz odwróconych – dwufazowa mieszanina składająca się z lipidów rozpuszczonych w rozpuszczalniku organicznym oraz buforu wodnego poddawana jest na krótko sonikacji. Następnie rozpuszczalnik usuwany jest pod niskim ciśnieniem, w rezultacie czego powstaje lepki żel. W ostatnim etapie podczas usuwania resztek rozpuszczalnika na wyparce obrotowej przy zmniejszonym ciśnieniu powstaje heterogeniczna zawiesina liposomów. Charakteryzują się one wysoką efektywnością zamykania do 65% w medium o niskiej sile jonowej. Wadą metody jest jednak kontakt zamykanego materiału rozpuszczonego w buforze z fazą organiczną. Dodatkowo, użycie sonikatora może uszkodzić strukturę zamykanego związku [62, 88];
- wstrzykiwanie roztworu etanolowego – polega na szybkim wstrzyknięciu do roztworu wodnego lipidów rozpuszczonych w etanolu. W rezultacie uzyskuje się populację pęcherzyków o różnej wielkości od 30 do 110 nm. Otrzymana zawiesina liposomów jest rozcieńczona i zawiera śladowe ilości etanolu [62, 67, 71, 86, 88, 89];
- technika zamrażania-rozmrażania – małe liposomy jednowarstwowe po sonikacji są szybko zamrażane w ciekłym azocie oraz powoli rozmrażane w wodzie o temperaturze około 40 °C. W wyniku tego procesu liposomy ulegają fuzji i powstają LUV charakteryzujące się efektywnością zamykania wynoszącą 20 – 30% [67, 68, 89];
- wstrzykiwanie roztworu eterowego – lipidy rozpuszczone w eterze dimetylowym lub mieszaninie eter/metanol wstrzykiwane są powoli do buforu wodnego

w temperaturze 55 – 65 °C pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstaje niejednorodna zawiesina liposomów o średnicy od 70 do 190 nm. Podobnie jak w przypadku odparowywania techniką faz odwróconych zamykany związek narażony jest na kontakt z rozpuszczalnikiem organicznym w wysokiej temperaturze [62, 67, 69, 89].

W powyższych metodach związki zamykane są przed lub w trakcie preparatyki liposomów. Można w tym przypadku mówić o tzw. pasywnym zamykaniu [62, 64, 67]. Jednakże niektóre związki posiadają jonizowalne grupy, które wykazują właściwości hydrofobowe oraz hydrofilowe w zależności od pH roztworu i mogą nie być efektywnie zamykane w liposomach ze względu na ich dyfuzję przez błonę fosfolipidową. W takim przypadku mogą one być zamykane w liposomach z wysoką efektywnością wynoszącą nawet powyżej 90% po utworzeniu liposomów przy wykorzystaniu techniki aktywnego zamykania [67, 74]. W metodzie tej przygotowuje się liposomy, których pH wewnątrz jest odpowiednie do zjonizowania leku, który w formie niezjonizowanej pasywnie może dyfundować przez błonę lipidową. W rezultacie lek po wnikięciu do wnętrza liposomu zostaje zjonizowany i nie jest już zdolny do ponownej dyfuzji przez dwuwarstwę fosfolipidową [71, 74, 80, 91].

I. 3. 4. Rodzaje liposomów

Pod względem składu, mechanizmu dostarczania leku do komórek docelowych oraz właściwości fizykochemicznych liposomy można podzielić na cztery główne grupy:

- 1) *Konwencjonalne* – są to liposomy zbudowane z jednego typu fosfolipidów (neutralnych lub anionowych) z dodatkiem cholesterolu lub też bez niego. Pomimo możliwości zmiany ich właściwości fizykochemicznych (rozmiaru, składu błony, liczby budujących je dwuwarstw, płynności błony), liposomy te charakteryzują się krótkim czasem przebywania w krwioobiegu. Przy dożylnym podaniu są one narażone na kontakt z białkami i komórkami, które w wyniku opsonizacji powierzchni liposomów redukują, a nawet całkowicie zapobiegają ich dotarciu do tkanek docelowych [51, 72]. Mogą one być również usuwane z krwioobiegu przez RES [90]. Dodatkowo interakcje liposomów z lipoproteinami, które destabilizują błonę pęcherzyków znacznie redukują ich

czas krążenia w krwioobiegu i powodują wyciek leku z nośnika zanim dotrze on do miejsca docelowego. Pomimo tych wad mogą one być wykorzystywane jako system dostarczania leków do wątroby oraz śledziony [51, 72].

- 2) *Sferycznie stabilizowane* – najbardziej popularną procedurą otrzymywania tego typu liposomów jest kowalentne przyłączenie hydrofilowego polimeru – glikolu polietylenowego do ich powierzchni zewnętrznej. Liposomy te nazywane są również „przestrzenie stabilizowanymi” ze względu na barierę przestrzenną, jaką tworzy polimer, która przeciwdziała interakcji liposomów z molekułami oraz innymi komponentami komórkowymi w środowisku biologicznym. Dzięki uniknięciu wychwycenia przez makrofagi ich połowkowy czas życia w organizmie może wynosić nawet 48 godzin [67, 68, 72, 73].
- 3) *Immunoliposomy* – posiadają specyficzne przeciwciała lub ich fragmenty przyłączone do zewnętrznej powierzchni liposomów w celu zwiększenia selektywności akumulacji w miejscu docelowym. Najczęściej do tego celu wykorzystuje się immunoglobuliny typu G. Wadą tych liposomów jest szybkie opuszczanie krwioobiegu i gromadzenie się w wątrobie oraz śledzionie. Dzięki zastosowaniu glikolu polietylenowego można uzyskać immunoliposomy o przedłużonym czasie krążenia w krwioobiegu [72, 73].
- 4) *Kationowe* – stanowią one kolejną grupę liposomów. Wykorzystywane są do przenoszenia materiału genetycznego [72]. Nie wykazują one selektywnej akumulacji w tkance docelowej i mogą ulegać fuzji prawie ze wszystkimi komórkami w organizmie dostarczając materiał genetyczny do jej wnętrza [80]. W celu poprawy selektywności i obniżenia efektów ubocznych stosuje się kombinację kationowych molekuł i aktywnego dostarczania liposomów do miejsca docelowego (patrz rozdział I. 3. 5.) [51].

I. 3. 5. Dostarczanie leków do komórek nowotworowych

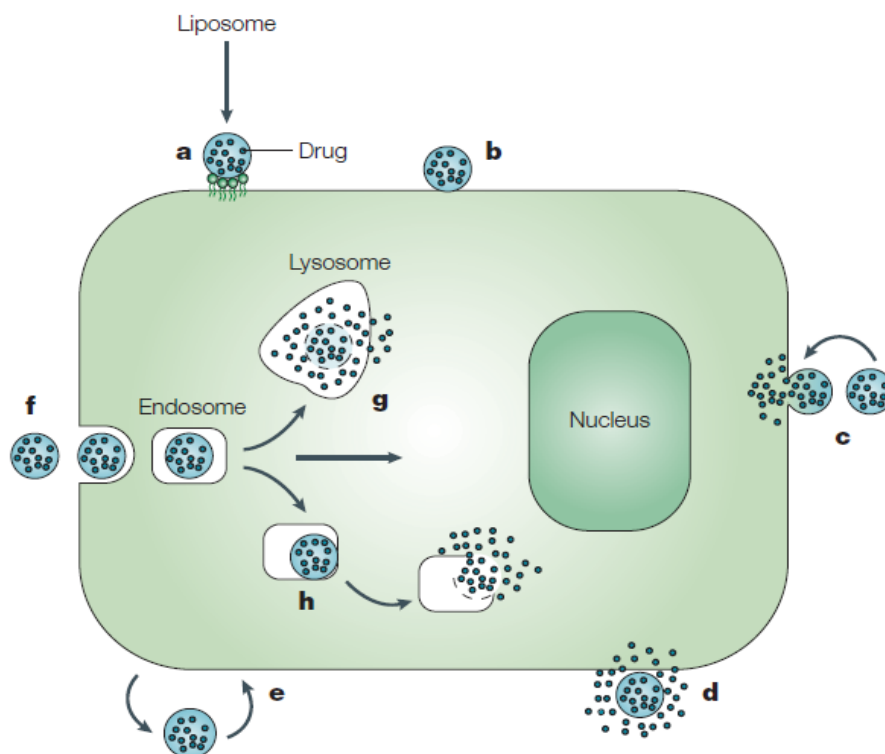
Guzy nowotworowe zaopatrywane są przez szybko rozwijające się, nieszczelne naczynia krwionośne. Pomiedzy komórkami śródbłónka występują szczeliny o wielkości od 100 do 1200 nm pozwalające makromolekułom o średnicy do 400 nm na łatwą migrację z krwioobiegu do chorej tkanki [51, 56, 62, 83]. W wyniku słabego drenażu

limfatycznego w guzie makromolekuły nie wracają tak efektywnie do centralnego obiegu krwionośnego, a zatem wydłuża się czas ich retencji w miejscu docelowym. Powyższe czynniki związane z budową guza mają wpływ na akumulację oraz zatrzymanie makromolekuł w tkankach nowotworowych. Zjawisko związane właśnie ze zwiększonym przenikaniem i przedłużonym czasem zatrzymywania związku w miejscu docelowym nazywane jest efektem EPR (z ang. enhanced permeability and retention). Przy wystarczająco długim czasie krążenia liposomów w krwioobiegu dzięki efektowi EPR są one pasywnie dostarczane do chorych tkanek, gdzie wykazują wysoką koncentrację w stosunku do zdrowych tkanek. W przypadku terapii fotodynamicznej, gdy fotouczulacze są zamykane w nośnikach liposomowych o rozmiarach 100 – 400 nm ich pasywna akumulacja w guzie zostaje zoptymalizowana [51, 56, 61, 63, 83].

W celu poprawy akumulacji liposomów z fotouczulaczem w tkankach nowotworowych, a tym samym efektywności terapii fotodynamicznej wykorzystuje się technikę aktywnego dostarczania liposomów do miejsca docelowego. Metoda ta minimalizuje niepożądane efekty związane z niespecyficznym gromadzeniem się fotouczulacza. Polega ona na przyłączeniu do powierzchni pęcherzyków specyficznych ligandów lub przeciwciał, które będą rozpoznawane i wiązane przez receptory oraz antygeny zlokalizowane na powierzchni komórek, do których ma być dostarczony światłoczuły związek. Metodę tę można zastosować zarówno do liposomów konwencjonalnych jak i stabilizowanych sferycznie, jednakże ze względu na czas przebywania liposomów w krwioobiegu głównie wykorzystuje się ją do pęcherzyków z glikolem polietylenowym [62, 83]. W ostatnich latach powstało wiele publikacji na temat badań *in vitro* liposomów z przeciwciałami monoklonalnymi, gdyż wykazują one wysoki stopień selektywnego dostarczania pęcherzyków do komórek rakowych. Jednakże ich ograniczenie stanowi cena oraz czasochłonna produkcja [65, 83]. Jak wcześniej wspomniano, oprócz przeciwciał do powierzchni liposomów mogą być również przyłączane ligandy takie jak witaminy (kwas foliowy), czynniki wzrostu (nabłonka lub nerwów), lipoproteiny (apolipoproteina B), lipoproteina niskiej gęstości LDL (z ang. low density lipoprotein) oraz inne glikoproteiny (transferyna). Są one użyteczne w dostarczaniu liposomów do komórek nowotworowych posiadających nadekspersję receptorów dla tych związków. W porównaniu do przeciwciał są one szeroko dostępne i niedrogie, jednakże z powodu częstej ekspresji zdrowych komórek na te same receptory są one mniej specyficzne w dostarczaniu liposomów do guza nowotworowego [55, 56, 65, 83, 84].

I. 3. 6. Uwalnianie leków zamkniętych w liposomach

Do uwolnienia substancji zamkniętej w pęcherzykach fosfolipidowych dochodzi najczęściej w wyniku czterech głównych interakcji pomiędzy liposomami a komórkami. Pierwsza z nich polega na wymianie lipidów pomiędzy liposomami a różnymi błonami komórkowymi. Wymiana ta zależy od stabilności dwuwarstwy fosfolipidowej i efekt ten można zredukować poprzez dodanie do składu błony liposomowej cholesterolu, który usztywnia dwuwarstwę i obniża możliwość wycieku zamkniętej w liposomach substancji [63, 66, 75, 79]. Drugi typ interakcji związany jest z absorpcją swoistą lub nieswoistą pęcherzyka fosfolipidowego na powierzchni komórki i zależy on od właściwości powierzchni liposomów [67, 74, 79]. Pęcherzyki mogą również ulegać fuzji z błoną komórkową uwalniając swą zawartość bezpośrednio do cytoplazmy. Mechanizm ten stanowi trzeci typ interakcji. W czwartym, ostatnim typie oddziaływania, liposomy mogą zostać wchłonięte przez komórkę w wyniku endocytozy i uwolnić swą zawartość wewnątrz komórki [63, 66, 75, 79]. Na rysunku 9 przedstawiono graficznie możliwe drogi uwalniania leku z liposomów w wyniku interakcji z komórką.



Rysunek 9: Możliwe interakcje liposomów zawierających lek z komórką: specyficzna (a) lub niespecyficzna (b) absorpcja liposomów na powierzchni komórki; fuzja liposomów z błoną komórkową (c) i uwolnienie zawartości bezpośrednio do cytoplazmy; destabilizacja liposomów przez pewne składniki błony komórkowej (d) i wnikięcie uwolnionego leku do komórki poprzez mikropinocytozę; bezpośrednia lub pośrednia przy wykorzystaniu białek wymiana składników lipidowych pomiędzy liposomami a błoną komórkową (e); specyficzna lub niespecyficzna endocytoza (f) – liposomy mogą być dostarczane za pomocą endosomu do lizosomu (g) lub liposom może powodować destabilizację endosomu (h) w obu przypadkach lek transportowany przez nośnik uwalniany jest do cytoplazmy [73].

Uwalnianie fotouczulacza z liposomu następuje głównie w trakcie naświetlania zmiany chorobowej. Pod kątem terapii fotodynamicznej jest to niekorzystne, gdyż wzbudzony światłoczuły związek często nie ma wystarczająco dużo czasu by dotrzeć do konkretnych organelli wewnątrz komórki. W konsekwencji powstałe reaktywne formy tlenu i tlen singletowy, posiadające ograniczony zasięg działania nie są w stanie doprowadzić do śmierci komórki. Z tego względu prowadzone są badania nad wykorzystaniem nośników liposomowych, które będą uwalniały zamknięte w nich substancje w wyniku zadziałania określonego czynnika [83]. Obecnie projektowane są liposomy, których błona ulega destabilizacji i wykazuje zwiększoną przepuszczalność poprzez podniesienie temperatury tkanki docelowej powyżej temperatury przejścia fazowego fosfolipidów, z których zbudowane są pęcherzyki (liposomy termoczułe) [68, 83]. Błona liposomów może również zawierać związki wrażliwe na zmianę pH otoczenia.

Skład błony ustala się głównie tak, aby wykazywała ona zwiększoną przepuszczalność dla zamkniętych w liposomach substancji przy pH z przedziału pomiędzy 5 a 6.3. W projektowaniu czułych na zmianę pH liposomów wykorzystuje się fakt, iż w tkankach nowotworowych wartość pH jest właśnie w tym zakresie [73, 81, 83]. Kolejnym przykładem impulsowego uwalniania leku jest zastosowanie liposomów fuzjogennych. Dzięki przyłączeniu do powierzchni liposomów fuzjogennych białek wirusowych są one zdolne, dzięki fuzji, do uwolnienia całej swojej zawartości bezpośrednio do cytoplazmy. Jednakże wadą tych liposomów jest to, że białka wirusowe definiują, do jakich typów komórek będą ukierunkowane liposomy [55, 83].

I. 3. 7. Zastosowanie liposomów

Ze względu na nietoksyczność, biodegradowalność oraz biokompatybilność liposomy są wykorzystywane, jako system dostarczania leków do miejsc zmienionych chorobowo w organizmie ludzkim. Ich zastosowanie zwiększa efektywność transportowanego związku między innymi poprzez redukcję jego agregacji w środowisku biologicznym, wzrost selektywności gromadzenia się w miejscu docelowym oraz ograniczenie kontaktu z zdrowymi tkankami. W medycynie oraz farmakologii zastosowanie liposomów można podzielić na diagnostyczne oraz terapeutyczne. Stanowią one również użyteczne narzędzie w procesie rozpoznawania sposobu działania oraz interakcji z komórkami różnych substancji [67, 69].

W terapii fotodynamicznej, jak na razie tylko jeden fotouczulacz zamknięty w formulacji liposomowej jest dopuszczony do leczenia. Komercyjna nazwa tego produktu to Visudyne, a światłoczuły związek zamknięty wewnątrz to werteporfina. Wykorzystywany jest on do leczenia pacjentów z wysiękową formą zwyrodnienia plamki żółtej związanej z wiekiem [58, 66, 83].

Liposomy są także wykorzystywane jako nośniki leków przeciwnowotworowych. Obecnie dwa antybiotyki z grupy antracyklin (daunorubicyna i doksorubicyna) są dostępne komercyjnie w formulacjach liposomowych. Pierwszy z nich daunorubicyna zamknięta w pęcherzykach fosfolipidowych nazywa się DaunoXome i stosowana jest do leczenia mięsaka Kaposiego. Natomiast drugi – doksyubicyna, dostępny jest na rynku w kilku formulacjach liposomowych, różniących się składem błony fosfolipidowej oraz

producentem. Są one wykorzystywane do leczenia raka piersi, jajników oraz mięsaka Kaposiego [66, 69, 79, 92].

Dzięki pasywnemu i aktywnemu dostarczaniu różnych substancji do tkanek docelowych pęcherzyki fosfolipidowe mogą być również wykorzystywane jako nośniki środków kontrastowych. Ich zadaniem jest nie tylko zwiększenie sygnału pomiędzy obszarem zainteresowania a tłem, ale także dostarczanie kontrastu do specyficznych tkanek i narządów. Ze względu na możliwość zamykania różnych substancji zarówno w dwuwarstwie fosfolipidowej jak i w przestrzeni wodnej, liposomy mogą być stosowane do transportu środków kontrastowych w różnego typu badaniach, w tym: rezonansie magnetycznym, tomografii komputerowej, ultrasonografii oraz scyntygrafii [88].

Pęcherzyki fosfolipidowe są także użyteczne w leczeniu infekcji pasożytniczych wywołanych przez różnego rodzaju wewnątrzkomórkowe patogeny takie jak pierwotniaki, bakterie czy grzyby znajdujące się w wątrobie lub śledzionie. Wykorzystując pasywnie celowane liposomy można dostarczać środki terapeutyczne do tych narządów. Przykładowo amfoterycyna B – antybiotyk polienowy, zamknięty w liposomach jest wykorzystywany do leczenia infekcji pasożytniczych w systemie RES. Komercyjna nazwa leku w formulacji liposomowej to AmBisome [66, 67, 69].

Liposomy wykorzystywane są również w terapii genowej do transportu materiału genetycznego [65, 69, 88] oraz w dermatologii do dostarczania aktywnych substancji pielęgnujących w głąb skóry [88]. Dodatkowo immunoliposomy znalazły zastosowanie przy produkcji szczepionki przeciw wirusowi HIV [85, 88]. W tabeli 3 przedstawiono przykładowe formułacje liposomowe leków dostępnych komercyjnie.

Tabela 3: Formulacje liposomowe leków dostępne komercyjnie [65, 66, 74, 89, 92-94].

Nazwa komercyjna	Lek	Skład liposomu (stosunek molowy)	Sposób podania	Przykładowe zastosowania
AmBisome (Gilead)	Amfoterycyna B	HSPC:DSPG:cholesterol (2:0.8:1)	Dożylnie	Leiszmanioza
Doxil/Caelyx (Johnson & Johnson)	Doksorubicyna	PEG 2000-DSPE-HSPC:cholesterol (5:56:39)	Dożylnie	Mięsak Kaposiego, rak jajników, rak piersi
DaunoXome (Galen)	Daunorubicyna	DSPC:cholesterol (2:1)	Dożylnie	Mięsak Kaposiego
Myocet (Cephalon)	Doksorubicyna	EPC:cholesterol (55:45)	Dożylnie	Rak piersi
Amphotec (Intermune)	Amfoterycyna B	Siarczan cholesterolu	Dożylnie	Inwazyjna aspergiloza
Abelcet (Enzon)	Amfoterycyna B	DMPC:DMPG (7:3)	Dożylnie	Aspergiloza
Visudyne (QLT)	Werteporfina	EPG:DMPC (3:5)	Dożylnie	Zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem
DepoDur (Pacira)	Siarczan morfiny	Cholesterol:triolein:DOPC:DPPG (11:1:7:1)	Zewnątrzoponowo	Znieczulenie bólu po zabiegu chirurgicznym
DepoCyt (Pacira)	Arabinozyd cytozyny	Cholesterol:triolein:DOPC:DPPG (11:1:7:1)	Dordzeniowo	Nowotworowe zapalenie opon mózgowych, zapalenie opon mózgowych w przebiegu chłoniaka
Lipo-Dox (Taiwan Liposome)	Doksorubicyna	DSPC:cholesterol:PEG 2000-DSPE (56:39:5)	Dożylnie	Mięsak Kaposiego, rak jajników oraz piersi
Marqibo (Talon)	Winkrystyna	Cholesterol:sfingomielina (45:55)	Dożylnie	Ostra białaczka limfoblastyczna

I. WSTĘP TEORETYCZNY

Epaxal (Swiss Serum Institute)	Inaktywowany wirus zapalenia wątroby (szczep RG-SB)	DOPC:DOPE (75:25)	Domięśniowo	Zapalenie wątroby typu A
Inflexal V (Berna Biotech)	Inaktywowane szczepionki zawierające hemaglutyninę szczepów A i B wirusa grypy	DOPC:DOPE (75:25)	Domięśniowo	Grypa

HSPC – fosfatydylocholina sojowa uwodorniona; *DSPG* – distearoilofosfatydyloglicerol; *DSPE-PEG 2000* – distearoilofosfatydyloetanolamina z glikolem polietylenowym; *DSPC* – distearoilofosfatydylocholina; *EPC* – fosfatydylocholina z jaj kurzych; *DMPC* – dimirystoilofosfatydylocholina; *DMPG* – dimirystoilofosfatydyloglicerol; *EPG* – fosfatydyloglicerol z jaj kurzych; *DOPC* – dioleoilofosfatydylocholina; *DPPG* – dipalmitoilofosfatydyloglicerol; *DOPE* dioleoilofosfatydyloetanolamina.

II. CEL I ZAKRES PRACY

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie oraz charakterystyka liposomów, jako potencjalnych nośników leków przeciwnowotworowych. Przed przystąpieniem do preparatyki pęcherzyków fosfolipidowych należało przeprowadzić badania pozwalające określić podstawowe parametry fizykochemiczne fotouczulaczy, które miały być w nich zamykane. Dopiero w drugim etapie pracy opracowano skład dwuwarstwy fosfolipidowej oraz uzyskano kompleks liposom-lek, który następnie scharakteryzowano.

Powyższe czynności miały na celu zwiększenie efektywności terapii fotodynamicznej poprzez zastosowanie liposomowych nośników leków. Dzięki ich wykorzystaniu istnieje możliwość między innymi zwiększenia selektywności dostarczenia leku do guza nowotworowego w stężeniu terapeutycznym przy jednoczesnym ograniczeniu jego kontaktu ze zdrowymi tkankami. Dodatkowo zamykanie fotouczulaczy hydrofobowych w liposomach może ograniczyć ich agregację w środowisku wodnym, przez co nie następuje obniżenie ich właściwości fototoksycznych.

Badania przeprowadzane w ramach pracy można podzielić na dwie części:

- 1) Charakterystyka fizykochemiczna fotouczulaczy, która polegała na wyznaczeniu następujących parametrów:
 - położenia pasm absorpcji oraz emisji;
 - wartości kwantowej wydajności fluorescencji oraz czasu jej życia;
 - czasu życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym;
 - wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego.

W ostatnim etapie badań związanych z charakterystyką fotouczulaczy określono ich fotostabilność.

- 2) Charakterystyka nośników liposomowych oraz kompleksu liposom-lek dotyczyła określenia poniższych właściwości:
 - średnicy pęcherzyków;
 - ich stabilności podczas przechowywania w temperaturze 3 °C;
 - efektywności zamykania leku w nośnikach;
 - oraz oceny skuteczności terapeutycznej uzyskanego kompleksu.

III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

III. 1. Odczynniki stosowane w badaniach

Rozpuszczalniki wykorzystane do badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej zostały zakupione w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne POCH S.A. (Tabela 4). Stopień czystości chemicznej stosowanych odczynników był większy niż 99%.

Tabela 4: Rozpuszczalniki stosowane w badaniach [95, 96].

Nazwa	Wzór	η [-]	Rodzaj rozpuszczalnika	Stężenie tlenu [O ₂] mM
Chloroform	CHCl ₃	1.4459	Niepolarny (aprotyczny)	2.4
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	1.4793	Polarny (aprotyczny)	0.46
Etanol (EtOH)	C ₂ H ₅ OH	1.36143	Polarny (protyczny)	2.1
Gliceryna	C ₃ H ₈ O ₃	1.4746	Polarny (protyczny)	0.07
Metanol (MeOH)	CH ₃ OH	1.32840	Polarny (protyczny)	2.1
Toluen	C ₆ H ₅ CH ₃	1.49693	Niepolarny (aprotyczny)	1.8

η – współczynnik załamania światła rozpuszczalnika dla temperatury 20 °C.

W tabeli 5 przedstawiono nazwy lipidów wykorzystanych do preparatyki liposomów. Czystość chemiczna zakupionych w firmie Avanti Polar Lipids odczynników jest większa niż 99% za wyjątkiem cholesterolu, dla którego była ona większa od 98%.

Tabela 5: Lipidy użyte do preparatyki liposomów.

Nazwa	Skrót	Masa molowa [g/mol]
Cholesterol	Chol	386.66
1,2-dioleilo-3-trimetyloamonioopropan	DOTAP	698.54
1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina	DPPC	734.04
1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-[fosfo-rac-1-glicerol]	DPPG	744.95
1,2-distearoilo-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy (glikol polietylenowy) 2000]	DSPE-PEG 2000	2805.50
1,2-distearoilo-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]	DSPG	801.06
L-α-fosfatydylocholina sojowa (uwodorniona)	HSPC	783.77

Pozostałe odczynniki stosowane w pracy wymieniono poniżej:

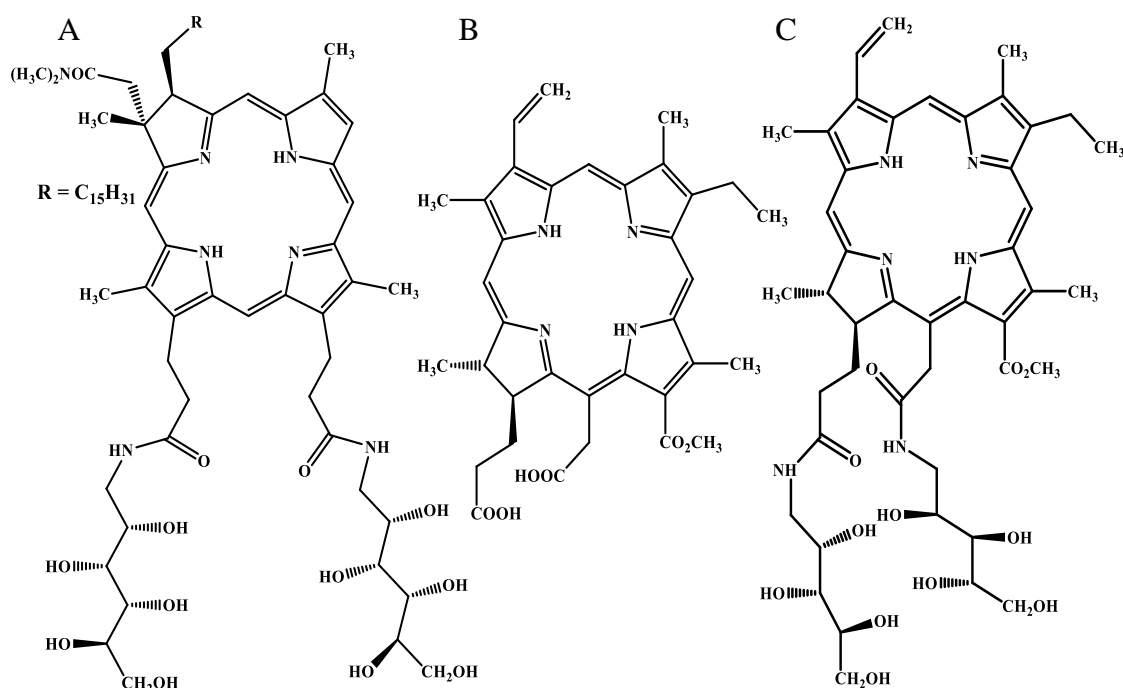
- bufor fosforanowy PBS (PAN Biotech);
- chlorek żelaza (III) 6 x H₂O (POCH S.A.);
- fenalenon (Sigma Aldrich);
- gentamycyna (Krka);
- ludox (Sigma Aldrich);
- medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium: F-12 (Sigma Life Science);
- medium Duplecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F12 Ham (Sigma Life Science);
- medium Opti-MEM® I (1x) + GlutaMax™ – I Reduced Serum Medium (Gibco®, Life Technologies™);
- mezo-tetrafenyloporfiryne TPP (Fluka);
- MTS – CellTriter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega);
- rodanek amonu (POCH S.A.);
- surowica – Fetal Bovine Serum Heat Inactivated (EURx);
- Triton X-100 Molecular Biology Grade (Promega);
- trypsyna EDTA (1x) (PAA Cell culture company);
- żel Sephadex G-50 Fine (Sigma Life Science).

III. 2. Badane fotouczulacze

W ramach niniejszej pracy doktorskiej do badań wykorzystano fotouczulacze z rodziny chloryn. Zostały one zsyntezowane przez profesora Franza-Petera Montfortsa w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu w Bremen, Niemcy. Testowane związki można podzielić na dwie grupy. W pierwszej z nich znajduje się palmitylowa pochodna chloryny z przyłączonymi dwoma łańcuchami cukrów. Związek ten nazwano chloryną *k* (chl *k*). Został on scharakteryzowany fizykochemicznie pod kątem wykorzystania go w terapii fotodynamicznej, jako lek przeciwnowotworowy. Po określeniu, czy chloryna *k* posiada odpowiednie z punktu widzenia terapii fotodynamicznej parametry, przeprowadzono wstępne eksperymenty z nośnikami liposomowymi.

Do drugiej grupy zalicza się monometylowy ester chloryny *e6* nazywany chloryną *e* (chl *e*) oraz jej cukrowa pochodna chloryna *c* (chl *c*). Parametry

fizykochemiczne tych fotouczulaczy zostały określone przez dr Marzenę Rams-Baron i zamieszczone w rozprawie doktorskiej pod tytułem „Poszukiwanie aktywnych związków fotouczulających pod kątem ich aplikacji w fotodynamicznej diagnostyce i terapii nowotworowej” [97]. Najsilniejszy efekt fotodynamiczny zaobserwowany dla chl *e* i chl *c* był podstawą ich wyboru do dalszych badań wykorzystujących nośniki liposomowe. Podstawowe właściwości fizykochemiczne obu związków przedstawiono w załączniku 1. Struktury badanych związków zamieszczono na rysunku 10.



Rysunek 10: Struktury chemiczne badanych fotouczulaczy: A) chloryna *k* $C_{62}H_{97}N_7O_{13}$ ($M = 1148.47$ g/mol); B) chloryna *e* $C_{35}H_{38}N_4O_6$ ($M = 610.70$ g/mol); C) chloryna *c* $C_{45}H_{60}N_6O_{12}$ ($M = 876.99$ g/mol).

III. 3. Preparatyka liposomów

Liposomy przygotowano techniką hydratacji suchego filmu fosfolipidowego, natomiast do redukcji rozmiarów wielowarstwowych liposomów wykorzystano metodę ekstruzji. Przy użyciu kalibratora ciśnieniowego LIPOKAL firmy P.P.H. Marker za pomocą sprężonego azotu liposomy przeciskano przez poliwęglanowe filtry membranowe. Do tego celu wykorzystano filtry Nuclepore o średnicy porów 100 nm firmy Whatman. Ze względu na trudności w rozpuszczeniu związków w buforze

fosforanowym badane chloryny zamykano w dwuwarstwie fosfolipidowej. Poniżej w kilku punktach przedstawiono szczegółowy opis preparatyki liposomów:

- 1) Przygotowano roztwory wykorzystywanych fosfolipidów o stężeniu 10 mg/mL w chloroformie lub mieszaninie chloroformu z metanolem w stosunku 1:1.
- 2) Rozpuszczono odważki badanych związków w niewielkiej objętości chloroformu (chl *k*) lub mieszaninie chloroformu z etanolem w stosunku 1:1 (chl *e i c*).
- 3) Odpowiednie objętości przygotowanych wcześniej roztworów fosfolipidów umieszczono w kolbkach okrągłodennych o pojemności 5 mL, w celu uzyskania ich mieszanin zawierającej 10 mg fosfolipidów. W tabeli 6 zamieszczono dokładny skład badanych liposomów oraz stosunki molowe pomiędzy poszczególnymi składnikami.
- 4) Do mieszanin fosfolipidów z pkt. 3 dodano odpowiednie objętości roztworów badanych związków.
- 5) Za pomocą wyparki próżniowej odparowano rozpuszczalnik organiczny, by uzyskać suchy film fosfolipidowy rozłożony równomiernie na ściankach kolbki. Następnie w celu dosuszenia filmu kolbki na czas jednej godziny umieszczono w liofilizatorze.
- 6) Po wyjęciu kolbek z liofilizatora wkładano do nich po dwie szklane kulki, które ułatwiały ścieranie filmu z powierzchni kolbki podczas jego uwadniania.
- 7) Do kolbek dodano po 1 mL roztworu uwadniającego (bufor fosforanowy o temperaturze około 64 °C) i intensywnie wytrząsano. Czynności te wykonywano w temperaturze 64 °C (powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów).
- 8) Otrzymane zawiesiny liposomów wielowarstwowych kalibrowano przeciskając je 8 – krotnie przez poliwęglanowe filtry membranowe o średnicy porów 100 nm w temperaturze 64 °C.

W efekcie końcowym uzyskano jednowarstwowe liposomy zawierające 100 μ M stężenie badanej chloryny, które następnie charakteryzowano pod kątem ich właściwości fizycznych oraz biologicznych.

Tabela 6: Skład lipidowy poszczególnych liposomów wykorzystywanych do badań.

Skład liposomów	Stosunek molowy	Typ liposomów ze względu na ładunek na powierzchni błony fosfolipidowej
HSPC/Chol	7:3	Neutralne
HSPC/DSPE-PEG 2000	9.5:0.5	Neutralne
HSPC/DOTAP/Chol	6:1:3	Kationowe
HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000	8.5:1:0.5	Kationowe
DPPC/DPPG	9:1	Anionowe
HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000	8.5:1:0.5	Anionowe

HSPC – fosfatydylocholina sojowa uwodorniona; *Chol* – cholesterol; *DSPE-PEG 2000* – distearoilofosfatydyloetanolamina z glikolem polietylenowym; *DOTAP* – dioleoiltrimetyloamoniopropan; *DPPC* – dipalmitoilofosfatydylocholina; *DPPG* – dipalmitoilofosfatydyloglicerol; *DSPG* – distearoilofosfatydyloglicerol.

III. 4. Komórki nowotworowe oraz warunki ich hodowli

Badania biologiczne przeprowadzono na komórkach raka jelita grubego linii HCT116. Linie tą pozyskano z Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów z Gliwickiego Oddziału Centrum Onkologii. Komórki hodowano w plastikowych butelkach o powierzchni 75 cm² firmy Nunc, które umieszczone były w inkubatorze w temperaturze 37 °C, w atmosferze, w której stężenie CO₂ wynosiło 5% a wilgotność 80%. Do hodowli wykorzystywano podstawową pożywkę – medium Dulbecco's Modified Eagle's F-12 wzbogacone o antybiotyk gentamycynę oraz surowicę Fetal Bovine Serum – 12%. Komórki pasażowano, co 3 – 4 dni z wykorzystaniem 0.25% roztworu trypsyny EDTA.

III. 5. Metodyka badań

III. 5. 1. Fizykochemiczna charakterystyka fotouczulaczy

III. 5. 1. 1. Spektroskopia optyczna UV-VIS

Spektroskopia optyczna UV-VIS zajmuje się oddziaływaniem z materiałą promieniowania elektromagnetycznego z zakresu światła widzialnego oraz nadfioletu. Ze

względem energii fotonów, wynoszącą od 2 do 10 eV, odpowiadającą odległościom elektronowych poziomów energetycznych atomów oraz cząsteczek, spektroskopia ta zajmuje się badaniem struktur elektronowych. Analizę przeprowadza się na podstawie zarejestrowanych widm, które pozwalają określić między innymi zależność między natężeniem światła a stężeniem badanej próbki. Widma wykorzystuje się również do wyznaczania poziomów energetycznych danego układu [98, 99].

W zależności od rodzaju wymiany energii między materią a promieniowaniem możemy wyróżnić spektroskopię absorpcyjną oraz emisyjną.

III. 5. 1. 1. 1. Spektroskopia absorpcyjna

Jednym z możliwych oddziaływań promieniowania elektromagnetycznego z materią jest zjawisko absorpcji. Polega ono na pochłonięciu charakterystycznego promieniowania przez molekuly w stanie podstawowym S_0 . Miarą absorpcji jest absorbancja, którą można zdefiniować za pomocą prawa Lamberta-Beera (1) [100]:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (1)$$

A – absorbancja;

ε – molowy współczynnik absorpcji;

c – stężenie próbki;

l – droga optyczna;

I_0 – natężenie promieniowania padającego na próbkę;

I – natężenie promieniowania po przejściu przez próbkę.

Do rejestracji widm absorpcyjnych wykorzystano dwuwiazkowy spektrofotometr U-2900 firmy Hitachi. Spektrofotometr wyposażony jest w dwa źródła światła: lampę deuterową i wolframową. Do rozdzielania światła na dwie wiązki służy monochromator Seya-Namionka z wklęsłą siatką dyfrakcyjną (1/600 mm), natomiast sygnał zbierany jest za pomocą fotodiody krzemowej. Widma absorpcyjne zarejestrowano w zakresie spektralnym od 300 do 800 nm, z krokiem pomiarowym 2 nm. Szerokość spektralna szczeliny wynosiła 1.5 nm, natomiast prędkość skanowania 1200 nm/min. Do pomiarów użyto kuwety kwarcowej o drodze optycznej 1 cm. Badania przeprowadzono dla chloryny rozpuszczonej w metanolu, chloroformie, dimetylosulfotlenku oraz glicerynie. Roztwory

fotouczulacza przygotowano w następujących stężeniach: 10^{-4} ; $5 \cdot 10^{-5}$; $2.5 \cdot 10^{-5}$; $1.25 \cdot 10^{-5}$; $6.25 \cdot 10^{-6}$ M. Ze względu na trudności związane z rozpuszczaniem związku w glicerynie rejestrację widm dla tego rozpuszczalnika wykonano tylko dla roztworu chloryny o stężeniu $5 \cdot 10^{-6}$ M. Dodatkowo w celu sprawdzenia, czy związek agreguje w środowisku wodnym przeprowadzono pomiar widm absorpcyjnych dla związku rozpuszczonego w samym buforze fosforanowym (PBS, pH 7.4) oraz z dodatkiem 0.5% Tritonu X-100. W tym przypadku stężenie fotouczulacza również wynosiło $5 \cdot 10^{-6}$ M. Powyższe badania przeprowadzono w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem.

III. 5. 1. 1. 2. Spektroskopia emisyjna

Jednym z procesów, podczas którego wzbudzona molekula po zaabsorbowaniu energii może powrócić do stanu podstawowego jest przejście promieniste – fluorescencja. Ze względu na jej krótki czas życia (nanosekundy) do rejestracji widm emisji stosuje się tzw. stacjonarny pomiar fluorescencji (z ang. steady-state fluorescence) polegający na ciągłym oświetlaniu próbki wiązką światła i równoczesnej detekcji promieniowania [99].

Do pomiaru widm emisyjnych i ekscytacyjnych wykorzystano spektrofluorymetr F-7000 firmy Hitachi wyposażony w 150 W lampę ksenonową. Widma emisji zarejestrowano w zakresie spektralnym od 550 do 800 nm, natomiast ekscytacji od 300 do 800 nm. W obu przypadkach krok pomiarowy wynosił 1 nm, prędkość skanowania 240 nm/min, a napięcie na detektorze 700 V. Szerokości szczelin emisyjnej oraz ekscytacyjnej ustawione były odpowiednio na 2.5 i 5 nm. Pomiary wykonano w kuwecie kwarcowej (droga optyczna 1 cm), w temperaturze pokojowej, w warunkach równowagi z otoczeniem, dla takich samych stężeń oraz rozpuszczalników, jak przy badaniach widm absorpcyjnych.

III. 5. 1. 2. Kwantowa wydajność fluorescencji

Stosunek liczby fotonów wyemitowanych w procesie fluorescencji do całkowitej liczby fotonów zaabsorbowanych przez molekulę nosi nazwę kwantowej wydajności fluorescencji. Ze względu na pewne trudności związane z izotropowym rozchodzeniem

się fluorescencji najczęściej stosowaną metodą wyznaczenia kwantowej wydajności fluorescencji jest metoda porównawcza. Opiera się ona na założeniu, iż zarówno stosowany związek referencyjny, o znanej wartości kwantowej wydajności fluorescencji, jak i badana próbka posiadają identyczną wartość absorpcji przy długości fali wzbudzenia, czyli są w stanie pochłonąć taką samą liczbę fotonów, natomiast będą się różnić intensywnością fluorescencji [101, 102].

W celu określenia kwantowej wydajności fluorescencji przygotowano serię roztworów badanego fotouczulacza oraz związku referencyjnego, dla których wartości absorpcji przy długości fali 418 nm (maksimum pasma Soreta wzorca) była w zakresie od 0.03 do 0.1. Następnie dla wszystkich próbek zarejestrowano widma emisji przy długości fali wzbudzającej 418 nm. W kolejnym etapie wykreślono krzywe zależności intensywności integralnej (pole powierzchni pod pasmem emisji) od absorpcji dla wzorca oraz fotouczulacza, do których następnie dopasowano funkcje liniowe. Na podstawie poniższego wzoru (2) wyznaczono wartości kwantowej wydajności fluorescencji [101], a błąd pomiaru obliczono metodą różnicznki zupełnej:

$$\Phi_{FL} = \Phi_{FL,S} \cdot \frac{a}{a_S} \cdot \frac{\eta^2}{\eta_S^2} \quad (2)$$

$\Phi_{FL,S}$; Φ_{FL} – kwantowe wydajności fluorescencji wzorca i próbki;

a_S ; a – współczynniki nachylenia prostej dla wzorca oraz próbki;

η_S ; η – współczynniki załamania światła rozpuszczalnika odpowiednio dla wzorca i próbki.

Jako wzorzec zastosowano mezo-tetrafenyloporfiryne, dla której wartość kwantowej wydajności fluorescencji w toluenie wynosi 0.11 [103]. Roztwory badanych fotouczulaczy przygotowano w metanolu, chloroformie, dimetylosulfotlenku oraz w glicerynie. Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm, w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem. Do ustalenia odpowiedniej wartości absorpcji przy długości fali wzbudzenia wykorzystano spektrofotometr Hitachi U-2900, natomiast do rejestracji widm emisji użyto spektrofluorymetru Hitachi F-7000.

III. 5. 1. 3. Czas życia fluorescencji

Czas życia fluorescencji (τ) definiowany jest jako średni czas, jaki wzbudzona molekula przebywa we wzbudzonym stanie singletowym zanim powróci do stanu podstawowego. Jest to ważny parametr pozwalający określić między innymi czas, jakim charakteryzuje się wzbudzony fluorofor dyfundując w danym środowisku lub z nim oddziałując. Dodatkowo zmiana długości czasu życia stanu wzbudzonego molekuł pozwala śledzić dynamiczne procesy zachodzące w roztworach i makromolekułach [99].

Do pomiarów czasów życia fluorescencji badanego związku rozpuszczonego w glicerynie wykorzystano spektrometr FluoTime 300 z modułem PicoHarp 300 firmy PicoQuant, GmbH. Spektrometr ten do rejestracji krzywych zaniku fluorescencji wykorzystuje technikę zliczania pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo TCSPC (z ang. time correlated single photon counting) [26]. Źródłem światła wzbudzającego był laser impulsowy LDH-D-C-485 (PicoQuant, GmbH) o szerokości spektralnej FWHM 485 ± 5 nm. Szerokość impulsu była mniejsza od 550 ps, a częstotliwość repetycji wynosiła 5 MHz. Laser kontrolowany był za pomocą sterownika PDL 800-D. Krzywe zaniku fluorescencji rejestrowano przy długości fal 642 i 670 nm. Szerokość szczeliny emisyjnej wynosiła 6 nm. W celu eliminacji detekcji światła wzbudzającego zastosowano filtr górnoprzepustowy odcinający promieniowanie poniżej 550 nm. Do rejestracji sygnału wykorzystano fotopowielacz R 3809U-50 firmy Hamamatsu. Zbieranie danych podczas pomiaru miało miejsce do momentu uzyskania maksymalnej liczby zliczeń w pojedynczym kanale, która wynosiła 10^4 . Pomiar intensywności fluorescencji w chwili czasu t ($I(t)$) wykonywany był przy ustawieniu kąta magicznego (54°). Otrzymane krzywe zaniku fluorescencji analizowano przy użyciu programu FluoFit (wersja 4.4, PicoQuant, GmbH). Do rejestracji szerokości czasowej wzbudzającego impulsu światła wykorzystano wzorec IRF (z ang. instrument response function), którym był wodny roztwór krzemionki koloidalnej – Ludox. Związek ten bardzo dobrze rozprasza padające na niego światło. Eksperyment przeprowadzono w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem, przy zastosowaniu kuwety kwarcowej o drodze optycznej 1 cm.

III. 5. 1. 4. Laserowa fotoliza błyskowa

Metoda laserowej fotolizy błyskowej jest stosowana do badania kinetyki oraz mechanizmów szybko przebiegających reakcji. Zasada działania tej techniki opiera się na oświetleniu próbki kilkunanosekundowym impulsem lasera, po którym następują procesy fotofizyczne takie, jak tworzenie, czy też zanik wzbudzonych stanów singletowych oraz trypletowych. Przy użyciu spektrometru do laserowej fotolizy błyskowej można badać zarówno absorpcję przejściową, jak i emisję promieniowania. W celu zmierzenia małych zmian absorbancji stosuje się rozbłysk lampy ksenonowej trwający kilkaset mikrosekund, którego zadaniem jest zwiększenie stosunku sygnału do szumu [25, 104].

III. 5. 1. 4. 1. Czas życia molekuł w stanie trypletowym

Skuteczność terapii fotodynamicznej zależy między innymi od właściwości fizykochemicznych fotouczulaczy, które powinny charakteryzować się wysoką zdolnością przejść do wzbudzonego stanu trypletowego. W zależności od stężenia tlenu w pobliżu leku zachodzą mogą dwa typy reakcji w wyniku, których powstają reaktywne formy tlenu i tlen singletowy prowadzące do śmierci komórek nowotworowych. Istotne jest, zatem, aby dany fotouczulacz posiadał relatywnie długi czas życia w stanie trypletowym, dzięki czemu jest on zdolny do efektywniejszego tworzenia tych fotoproduktów [7, 24].

Pomiar czasu życia wzbudzonych cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym wykonano za pomocą spektrometru do laserowej fotolizy błyskowej LKS 60 firmy Applied Photophysics. Do wzbudzenia próbki użyto trzeciej harmonicznej (355 nm) nanosekundowego lasera Nd-YAG firmy Brilliant. Maksymalna moc pojedynczego impulsu wynosiła 100 mJ, natomiast moc chwilowa 20 MW. Wiązką detekcyjną był błysk lampy ksenonowej o mocy 150 W (OSRM XBO CR-OFR). Układ pomiarowy wyposażony był w monochromator firmy Applied Photophysics z siatką dyfrakcyjną 1/1200 mm pozwalający rejestrować widma w zakresie spektralnym od 200 do 1000 nm. Do rejestracji sygnału wykorzystano fotopowielacz firmy Applied Photophysics.

Wartość absorbancji dla związku rozpuszczonego w metanolu przy długości fali wzbudzenia 355 nm wynosiła 0.2. W pierwszej kolejności dobierano wartości napięcia na fotopowielaczu tak, aby intensywność światła docierająca do monochromatora dla każdej długości fali wynosiła 300 mV. Następnie zarejestrowano widmo przejścia

tryplet-tryplet (300 – 800 nm), w celu wyznaczenia długości fali, dla której rejestrowane były kinetyczne krzywe zaniku absorpcji. Krzywe te rejestrowano 10-krotnie w celu wyznaczenia średniego czasu życia stanu trypletowego oraz odchylenia standardowego. Za każdym razem sygnał uśredniany był z dziesięciu impulsów lasera wzbudzających związek. W trakcie tego eksperymentu podstawa czasowa na oscyloskopie Infiniium DSO9064A firmy Agilent Technologies wynosiła 100 ns/div. Pomiaru zostały przeprowadzone w kuwecie kwarcowej (droga optyczna 1 cm) w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem oraz zbliżonych do beztlenowych. W celu usunięcia tlenu z próbki przedmuchiwano ją przez 30 minut azotem. Stałą szybkości zaniku stanów trypletowych wyznaczono za pomocą równania Sterna-Volmera (3) [104]:

$$k_q = \left[\frac{1}{\tau_{T,O_2}} - \frac{1}{\tau_{T,N_2}} \right] \cdot \frac{1}{[O_2]} \quad (3)$$

k_q – stała wygaszania stanu trypletowego;

τ_{T,O_2} – średni czas życia stanu trypletowego w środowisku tlenowym;

τ_{T,N_2} – średni czas życia stanu trypletowego w środowisku beztlenowym;

$[O_2]$ – stężenie tlenu w roztworze.

III. 5. 1. 4. 2. Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego

Pomimo tego, iż tlen singletowy został odkryty w 1924 roku nadal stanowi on przedmiot zainteresowania w wielu laboratoriach. Ze względu na jego właściwości fizyczne, chemiczne oraz biologiczne uważany jest za silny utleniacz, który wykorzystywany jest nie tylko w terapii fotodynamicznej, ale również do badań nad polimerami. Możliwość generowania tlenu singletowego określa się poprzez pomiar jego kwantowej wydajności [105, 106].

Do wyznaczenia kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego wykorzystano odpowiednio zmodyfikowany układ do laserowej fotolizy błyskowej. Zastosowano schładzany do – 60 °C detektor Hamamatsu NIR PMT MODULE (zakres spektralny od 950 do 1400 nm), siatkę dyfrakcyjną w monochromatorze zmieniono na 1/600 mm, dodatkowo układ wyposażono w filtr odcinający promieniowanie poniżej 850 nm (filtr górnoprzepustowy).

Wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego uzyskano metodą porównawczą. Wykorzystuje ona możliwość detekcji emisji promieniowania tlenu singletowego przy długości fali 1270 nm. W pierwszym etapie przygotowano roztwór badanego fotouczulacza oraz wzorca w metanolu, o znanej wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego, tak by absorbancja przy długości fali wzbudzenia 355 nm wynosiła 0.25 i wykonano rejestrację widm fosforescencji tlenu w zakresie spektralnym od 1220 do 1320 nm. Następnie zarejestrowano kinetyczne krzywe zaniku fosforescencji przy długości fali 1270 nm dla różnych wartości energii lasera. W ostatnim kroku wykreślono krzywe zależności intensywności emisji w czasie $t = 0$ od względnej energii lasera zarówno dla badanej próbki jak i wzorca. Wartość intensywności fosforescencji tlenu w czasie $t = 0$ uzyskano poprzez dopasowanie do krzywej funkcji monoeksponencjalnej. Następnie przy wykorzystaniu poniższego wzoru (4) wyznaczono kwantową wydajność generowania tlenu singletowego [103, 107], a błąd pomiaru obliczono metodą różniczki zupełnej:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta,S} \cdot \frac{a}{a_S} \quad (4)$$

Φ_{Δ} , $\Phi_{\Delta,S}$ – kwantowe wydajności generowania tlenu singletowego odpowiednio przez badany fotouczulacz oraz wzorzec;

a , a_S – współczynniki nachylenia prostej dla badanej próbki oraz wzorca.

W metodzie tej, jako wzorzec wykorzystano fenalenon, którego wartość kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego w metanolu wynosi 0.97 [108]. Pomiary wykonywane były w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem, przy zastosowaniu kuwety kwarcowej o drodze optycznej 1 cm.

III. 5. 1. 5. Stabilność i fotodegradacja

Kolejną właściwością charakteryzującą potencjalne substancje lecznicze jest ich stabilność podczas przechowywania przy ograniczonym dostępie światła. W tym celu rejestrowano widma absorpcyjne dla roztworu badanego związku o stężeniu 25 μM w dimetylosylfotlenku. Badania przeprowadzono bezpośrednio po sporządzeniu roztworu, a następnie po 7 i 14 dniach. Z analizy uzyskanych widm wyznaczono procentowy spadek absorbancji dla pasma Soreta oraz ostatniego pasma Q.

Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej ważne jest również określenie fotostabilności testowanych związków. Eksperyment miał na celu sprawdzenie, czy potencjalny lek nie zmienia swoich właściwości fotofizycznych podczas ekspozycji na światło. Badania przeprowadzono dla związku rozpuszczonego w dimetylosulfotlenku (stężenie fotouczulacza 20 μM). Do naświetlania wykorzystano oświetlacz halogenowy firmy Optel. Światłowody z lampy zakończone filtrem odcinającym światło poniżej 630 nm zostały ustawione w odległości 2 cm od szalki Petriego z badanym roztworem leku. Dodatkowo szalka została umieszczona na mieszadle magnetycznym. Pomiar fotostabilności wykonywano dla różnych czasów naświetlań wynoszące od 1 do 20 minut, co odpowiadało dawkom z zakresu 2 – 45 J/cm^2 . Kontrolę stanowiła próbka niepodawana działaniu światła.

Ocenę fotodegradacji związku pod wpływem światła dokonano w oparciu o analizę widm absorpcyjnych rejestrowanych w zakresie spektralnym 300 – 800 nm po każdym naświetleniu. Do pomiaru widm absorpcyjnych wykorzystano spektrofotometr Hitachi U-2900. Badania przeprowadzono w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem, przy użyciu kuwety kwarcowej o drodze optycznej 1 cm.

III. 5. 2. Charakterystyka nośników liposomowych

III. 5. 2. 1. Rozmiar pęcherzyków fosfolipidowych

Określenie rozmiaru uzyskanych liposomów ma kluczowy wpływ na ich zastosowanie [66]. W zależności od sposobu podania, czy też miejsca docelowego, w którym nośniki powinny się selektywnie gromadzić należy zastosować liposomy o konkretnej średnicy. Na przykład liposomy podawane przez skórnie powinny mieć niewielkie rozmiary (100 – 200 nm), aby mogły przecisnąć się przez warstwy rogowe naskórka [75]. W celu osiągnięcia optymalnej akumulacji fotouczulacza w komórkach raka wykorzystuje się nośniki o średnicy w zakresie od 100 do 400 nm. Związane jest to z faktem, że guzy nowotworowe zaopatrywane są przez nieszczelne naczynia krwionośne, dzięki czemu cząsteczki są zdolne do łatwej migracji z krwioobiegu do chorej tkanki [51]. W związku z powyższym ważne jest, aby produkcja liposomów była przewidywalna, powtarzalna, a uzyskane pęcherzyki fosfolipidowe charakteryzowały się odpowiednią średnicą.

Do pomiaru średnicy uzyskanych liposomów zastosowano analizator wielkości cząstek Zetasizer Nano ZS firmy Malvern. Urządzenie wykorzystuje technikę dynamicznego rozpraszania światła do wyznaczenia prędkości ruchów Browna, które następnie przelicza na średnicę badanych cząstek. Źródłem światła jest laser He-Ne (czerwony, 633 nm), kąt detekcji wynosi 173°, a zakres pomiarowy od 0.6 nm do 6 µm. Eksperyment przeprowadzano w kuwetach polistyrenowych o drodze optycznej 1 cm w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem. Średnicę cząstek mierzono kilkakrotnie dla danej próbki. Dodatkowo przed badaniem początkową zawiesinę rozcieńczano w następujący sposób: do 990 µL buforu fosforanowego dodawano 10 µL testowanego roztworu.

III. 5. 2. 2. Stabilność

Nośniki liposomowe powinny być scharakteryzowane pod kątem stabilności, jak każde inne farmaceutyki. Należy sprawdzić między innymi, przez jaki okres czasu przechowywane liposomy nie ulegną agregacji [66].

Pomiar stabilności wykonano za pomocą analizatora wielkości cząstek Zetasizer Nano ZS (Malvern). Eksperyment polegał na pomiarze średnicy liposomów w kolejnych dniach od momentu ich przygotowania. Zawiesina liposomowa była przechowywana przy ograniczonym dostępie światła w temperaturze 3 °C. Badania przeprowadzono w identyczny sposób jak pomiar średnicy cząstek.

III. 5. 2. 3. Efektywność zamykania leku

Kolejnym parametrem istotnym przy projektowaniu liposomów, jako nośników leków przeciwnowotworowych jest procentowe określenie ilości substancji w nich zamkniętej. W ramach niniejszej pracy doktorskiej efektywność zamykania leku w liposomach wyznaczono na podstawie stosunku stężenia fotouczulacza przypadające na 1 mg fosfolipidów przed i po przesączeniu na kolumnie wypełnionej żelą Sephadex G-50 Fine (5.5 x 70 mm) [109].

W pierwszej kolejności określono stężenie leku zamkniętego w liposomach oraz stężenie fosfolipidów bezpośrednio po uwodnieniu suchego filmu fosfolipidowego.

III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

Następnie w celu usunięcia niezamkniętego leku nanoszono 50 µL zawiesiny na kolumnę równoważoną buforem fosforanowym. Dla zebranej frakcji liposomów określono również stężenie fotouczulacza zamkniętego w liposomach oraz stężenie fosfolipidów. Za pomocą poniższego wzoru (5) obliczono procentowo efektywność zamykania badanych fotouczulaczy w testowanych liposomach [109]. Do wyznaczenia stężenia leku wykorzystano metodę spektrofotometryczną (załącznik 2), natomiast w przypadku fosfolipidów metodę Stewarda (załącznik 3). Dla każdego typu liposomu przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty, a otrzymane wyniki uśredniono i wyznaczono dla nich wartość odchylenia standardowego.

$$\%EE = \frac{\frac{Drug \left[\frac{mg}{mL} \right]}{Lipid \left[\frac{mg}{mL} \right]}}{Initial \frac{D}{L}} \cdot 100\% \quad (5)$$

%EE – efektywność zamykania leku wyrażona w procentach;

Drug – stężenie badanego fotouczulacza;

Lipid – stężenie fosfolipidów;

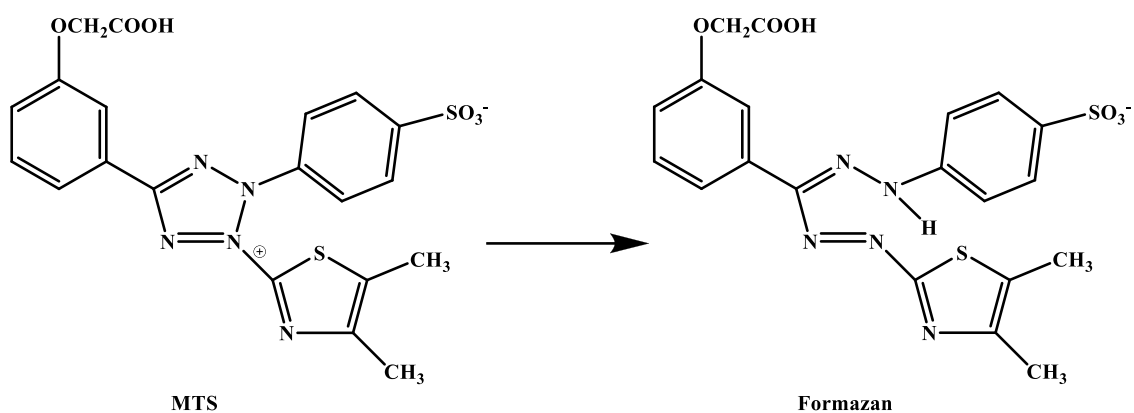
Initial D/L – wartość początkowa stosunku lek/fosfolipid określona w momencie uwodnienia cienkiego filmu fosfolipidowego.

Pomiary wykonano w temperaturze pokojowej w warunkach równowagi z otoczeniem. Stężenie związku wyznaczono przy użyciu spektrofotometru Hitachi F-7000, a fosfolipidów Hitachi U-2900. W obu przypadkach badania przeprowadzono w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej równej 1 cm.

III. 5. 2. 4. Ocena przeżywalności komórek nowotworowych

Do określenia liczby zdolnych do przeżycia komórek w badaniach biologicznych wykorzystano test MTS. Jest to kolometryczna metoda polegająca na redukcji soli błękitu tetrazolowego do barwnego formazanu (Rysunek 11). Konwersja ta zachodzi prawdopodobnie dzięki NADPH lub NADH produkowanym przez enzymy dehydrogenazy w metabolicznie aktywnych komórkach. Barwną substancją dodawaną do komórek jest 3-(4,5-dimetylotiozol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol (MTS). Ilość formazanu określana jest na podstawie pomiaru

absorbancji przy długości fali 490 nm, która jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek w hodowli [110].



Rysunek 11: Konwersja soli błękitu tetrazolowego do barwnego formazanu [110].

Test MTS wykonano zgodnie z protokołem CellTriter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay [110]. Po usunięciu z szalek medium hodowlanego dodano 700 μ L medium bez czerwieni oraz 130 μ L reagentu MTS i umieszczano na 15 minut w inkubatorze. W celu odczytu absorbancji przy długości fali 490 nm zawartość szalek przekładano na płytki 96-dołkowe po 120 μ L do każdego dołka. Do pomiaru absorbancji wykorzystano czytnik płytek Synergy firmy BioTek, a procent komórek przeżywających wyznaczono za pomocą wzoru (6):

$$FP = \frac{A}{A_K} \cdot 100\% \quad (6)$$

FP – frakcja przeżywająca;

A – wartość absorbancji odczytana dla badanej grupy;

A_K – wartość absorbancji odczytana dla grupy kontrolnej.

Ocenę przeżywalności komórek wykonano dla następujących eksperymentów biologicznych:

- 1) Ocena toksyczności ciemnej pustych liposomów.
- 2) Ocena toksyczności ciemnej badanych związków.
- 3) Ocena toksyczności ciemnej liposomów z badanym związkiem.
- 4) Ocena fototoksyczności badanych związków.
- 5) Ocena fototoksyczności kompleksu liposom-fotouczulacz.

III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

Grupę kontrolną w powyższych badaniach stanowiły komórki nowotworowe niepoddawane działaniu światła, ani żadnemu innemu czynnikowi zewnętrznemu. W przypadku badania fototoksyczności oceniano również wpływ światła na proliferację komórek.

Przed przystąpieniem do eksperymentów komórki odklejano od podłoża (0.25% roztwór trypsyny), a następnie odwirowywano przy użyciu wirówki Megafuge 16R firmy Thermo Scientific (1800 rpm, 5 minut) i zliczano przy pomocy automatycznego czytnika TC10™ (Bio-rad). W kolejnym etapie komórki wysiewano na szalkach Petriego o średnicy 3 cm w ilość 300 000 komórek/szalkę i na 24 godziny umieszczano w inkubatorze. Procedurę wykonywania dalszych czynności można podzielić na dwa typy w zależności, czy komórkom nowotworowym podawano związek w postaci wolnej, czy też zamknięty w liposomach:

- 1) *Formulacje liposomowe* – wysianym wcześniej na szalkach Petriego komórkom nowotworowym zmieniono medium na Opti-MEM® I i podano następujące objętości liposomów pustych oraz liposomów z badanym fotouczulaczem: 5 μ L; 10 μ L; 25 μ L; 50 μ L. W przypadku liposomów z lekiem uzyskano stężenia aplikowanego związku wynoszące odpowiednio 0.5 μ M; 1 μ M; 2.5 μ M oraz 5 μ M. Następnie wszystkie szalki inkubowano przez 4 godziny. Po tym czasie szalki przepłukano buforem fosforanowym i ponownie zmieniono medium. W przypadku badań toksyczności ciemnej była to pożywka podstawowa (medium Dulbecco's Modified Eagle's F-12 wzbogacone o antybiotyk gentamycynę oraz surowicę Fetal Bovine Serum – 12%), a przy ocenie fototoksyczności medium bez czerwieni – Duplecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F12 Ham. Szalki do badania toksyczności ciemnej umieszczono w inkubatorze na 24 godziny, pozostałe natomiast naświetlano światłem czerwonym. Źródłem światła była skolimowana wiązka diody LED o długości fali 660 nm (M660 L3-C4, Thorlabs). Do obsługi diody zastosowano sterownik wysokiej mocy z modulacją impulsowa DC2100 firmy Thorlabs. Czasy naświetlań wynosiły 1 i 3 minuty, co odpowiadało dawkom 4.2 oraz 12.5 J/cm² (w przypadku chl *k* ze względu na niewielkie ilości próbki do badań wykonano eksperyment tylko dla jednego czasu naświetlań wynoszącego 3 minuty). Komórkom po naświetlaniu również zmieniono medium na pożywkę podstawową i umieszczono w inkubatorze, podobnie jak komórki do badania toksyczności ciemnej. Po 24 godzinach oceniono frakcję komórek przeżywających za pomocą testu MTS.

- 2) *Fotouczulacze* – przygotowane roztwory badanych związków w DMSO rozcieńczano w medium hodowlanym, tak by uzyskać stężenia odpowiednie do tych, które wykorzystywano przy formulacjach liposomowych. Komórki nowotworowe z badanymi fotouczulaczami inkubowano przez 4 godziny. W dalszych etapach eksperymentu wykonywano czynności analogicznie do tych opisanych w pkt. 1.

Powyższe eksperymenty przeprowadzono w warunkach sterylnych ograniczając wpływ światła zewnętrznego. Test MTS powtarzano 3-krotnie. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich wraz z błędem pomiarowym wyznaczonym na podstawie odchylenia standardowego.

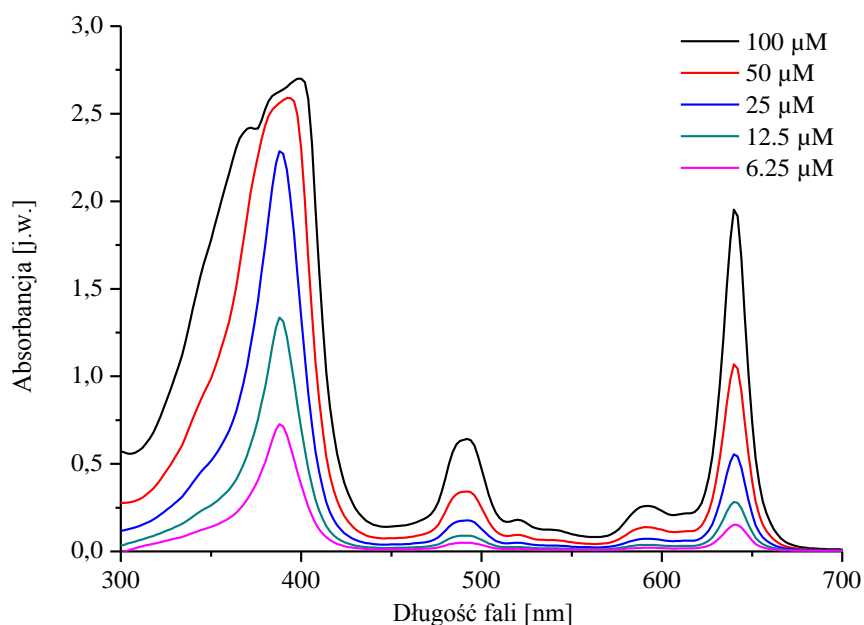
Ocenę różnic przeżywalności komórek inkubowanych z testowanymi kompleksami liposom-lek w porównaniu do samego fotouczulacza przeprowadzono w oparciu o analizę statystyczną. Wykonano ją dla danych otrzymanych z badania fototoksyczności. W pierwszej kolejności za pomocą testu Shapiro-Wilka sprawdzono, czy badane próby mają rozkład normalny. Następnie przy wykorzystaniu testu nieparametrycznego U Manna-Whitneya, służącego do porównywania dwóch niezależnych grup przeprowadzono analizę statystyczną. Różnice pomiędzy analizowanymi zmiennymi uznawano za istotnie statystycznie w przypadku, gdy wartość $p < 0.05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica (version 10), a różnice istotne statystycznie oznaczono gwiazdką (*) na wykresach.

IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

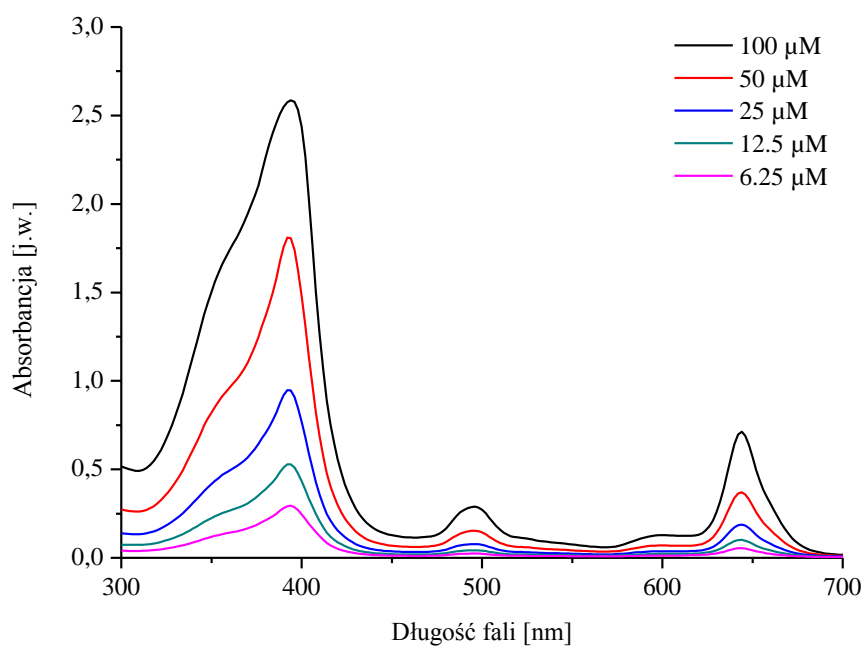
IV. 1. Charakterystyka badanego fotouczulacza

IV. 1. 1. Widma absorpcji i molowy współczynnik absorpcji

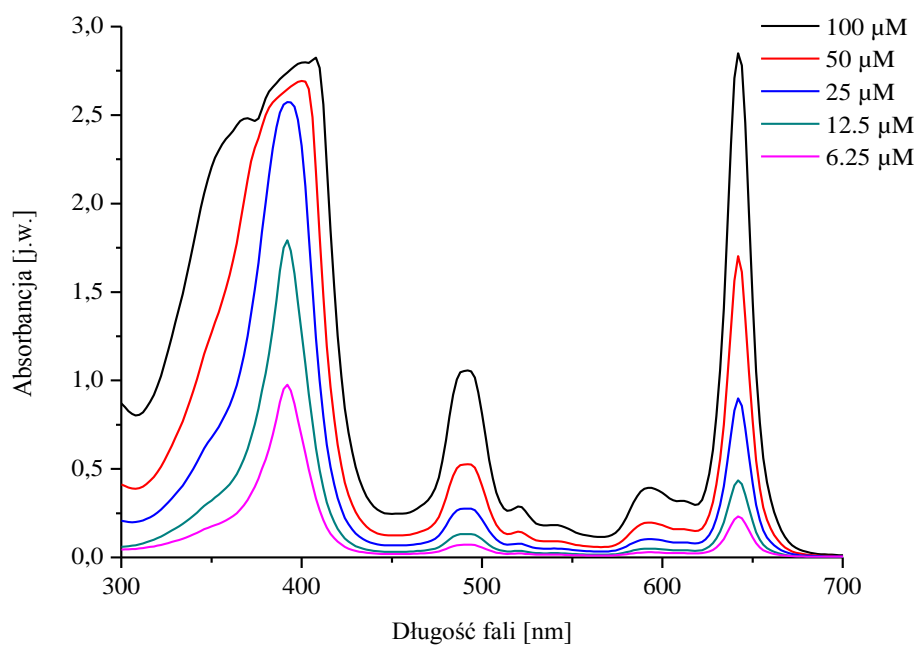
W celu określenia właściwości spektralnych badanego związku przeprowadzono pomiary widm absorpcyjnych. Zarejestrowane dla chl *k* widma absorpcyjne są widoczne na wykresach 1 – 4, natomiast w tabeli 7 przedstawiono położenia poszczególnych pasm absorpcji oraz wartości molowego współczynnika absorpcji wyznaczone na podstawie wzoru (1) (rozdział III. 5. 1. 1. 1).



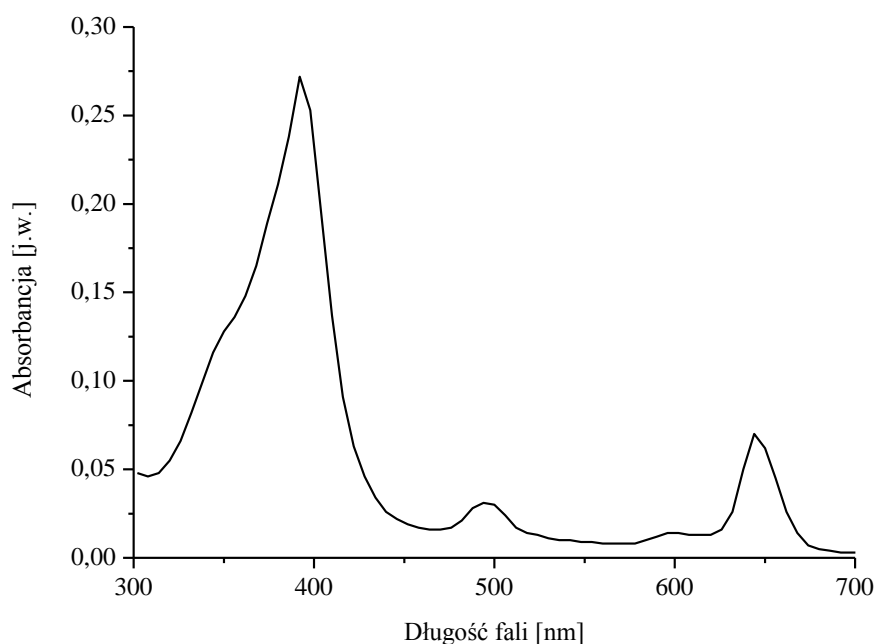
Wykres 1: Widmo absorpcyjne roztworu chl *k* w metanolu.



Wykres 2: Widmo absorpcyjne roztworu chl *k* w chloroformie.



Wykres 3: Widmo absorpcyjne roztworu chl *k* w dimetylosulfotlenku.



Wykres 4: Widmo absorpcyjne roztworu chl *k* w glicerynie (stężenie 5 μM).

Tabela 7: Położenia pasm absorpcji oraz wartości molowego współczynnika absorpcji dla chl *k*.

Rozpuszczalnik	Położenie pasm absorpcji [nm] Molowy współczynnik absorpcji $\varepsilon \cdot 10^4$ [M ⁻¹ ·cm ⁻¹]				
	Soret	Pasma Q			
Metanol	388 11.15	492 0.71	520 0.20	592 0.29	640 2.20
Chloroform	394 4.47	496 0.33	524 0.14	600 0.16	644 0.77
Dimetylosulfotlenek	392 14.98	492 1.08	522 0.31	594 0.44	642 3.41
Gliceryna	393 0.55	496 0.06	523 0.03	600 0.03	645 0.14

Położenia pasm z zakresu promieniowania widzialnego są przypisane do przejść elektronowych $\pi \rightarrow \pi^*$ [111]. Badany związek posiada typowe dla tej rodziny związków widmo elektronowe charakteryzujące się intensywnym pasmem Soreta w okolicy 400 nm oraz czterema mniej intensywnymi pasmami Q w zakresie spektralnym od 490 do 645 nm. Dodatkowo ostatnie pasmo Q posiada najwyższe wartości molowego współczynnika absorpcji (Tabela 7), co jest charakterystyczne dla tego typu związków [15].

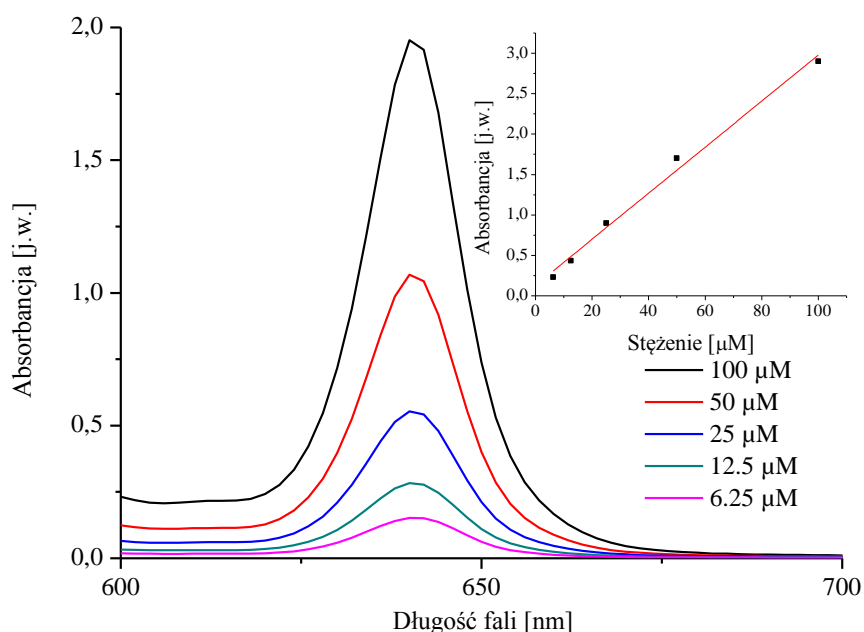
W zależności od środowiska, w jakim jest rozpuszczony badany związek mogą się zmieniać jego fotofizyczne właściwości. Przeważnie obserwuje się przesunięcie poszczególnych pasm absorpcji, zmianę ich kształtu oraz intensywności [112,113]. Ocena wpływu różnych środowisk na badane związki ma duże znaczenie na przebieg terapii fotodynamicznej. Pozwala określić jak będzie zachowywał się fotouczulacz w kontakcie z innymi związkami w komórce [114]. Porównując położenia poszczególnych pasm absorpcji uzyskanych dla związku rozpuszczonego w metanolu ze związkiem w chloroformie oraz dimetylosulfotleniu widoczne jest przesunięcie batochromowe. Najbardziej przesunięte jest widmo dla roztworu chl *k* w rozpuszczalniku niepolarnym (chloroform), co prawdopodobnie świadczy o relatywnie silnej interakcji pomiędzy cząsteczkami związku a rozpuszczalnikiem [112]. Dodatkowo poszczególne pasma absorpcji dla roztworów chloryny o stężeniach od 25 do 6.25 μM w rozpuszczalnikach polarnych (metanol, dimetylosulfotlenek) są węższe niż dla roztworów związku w rozpuszczalniku niepolarnym. Zaobserwowano również, że wartości molowych współczynników absorpcji dla roztworów fotouczulacza w rozpuszczalnikach polarnych są wyższe od tych otrzymanych dla roztworu chl *k* w rozpuszczalniku niepolarnym.

Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej potencjalny lek powinien posiadać pasmo absorpcji w okolicy 600 – 850 nm oraz możliwie wysoką wartość molowego współczynnika absorpcji. Analizując wyniki otrzymane dla chl *k* wynika, iż może ona być stosowana do leczenia głębiej położonych w organizmie ludzkim zmian nowotworowych niż przy wykorzystaniu komercyjnego związku Photofrin, który posiada ostatnie pasmo zlokalizowane przy długości fali 630 nm. Dodatkowo badany związek posiada wyższą od Photofrinu ($3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dla długości fali 630 nm) wartość molowego współczynnika absorpcji dla ostatniego pasma Q (Tabela 7), przez co można zastosować znaczne niższe stężenia badanego fotouczulacza do uzyskania odpowiedniego efektu terapeutycznego (wyjątek jednak stanowi wartość molowego współczynnika absorpcji dla związku rozpuszczonego w glicerynie) [14, 33].

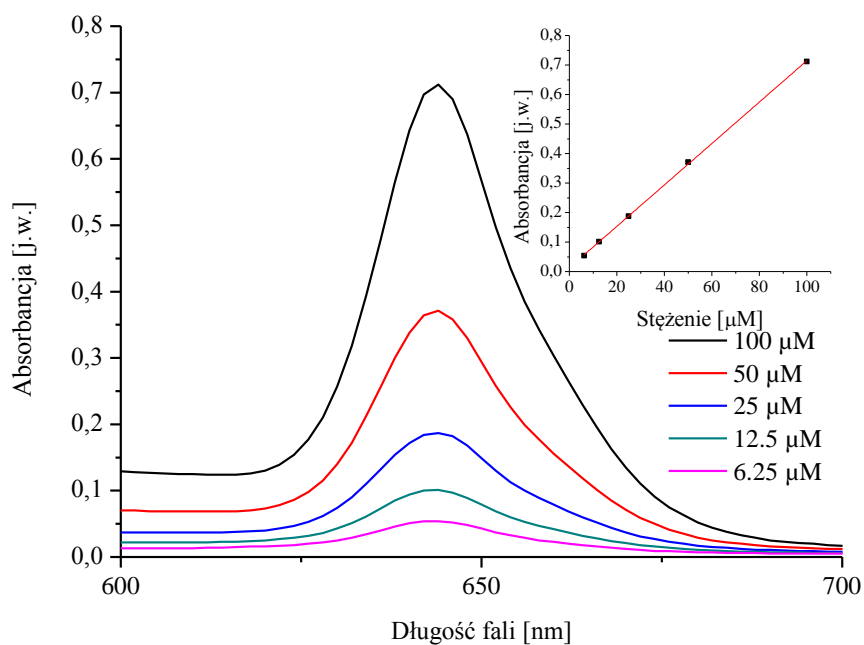
Kolejnym ważnym aspektem w terapii fotodynamicznej jest to, aby potencjalny lek nie ulegał agregacji w środowisku wodnym. Istnieje wiele źródeł informacji potwierdzających, iż zagregowany związek obniża efektywność terapii poprzez redukcję między innymi kwantowej wydajności fluorescencji oraz wydajności generowania tlenu singletowego [60, 115-117]. W celu sprawdzenia, czy chl *k* ulega agregacji wykreślono

IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

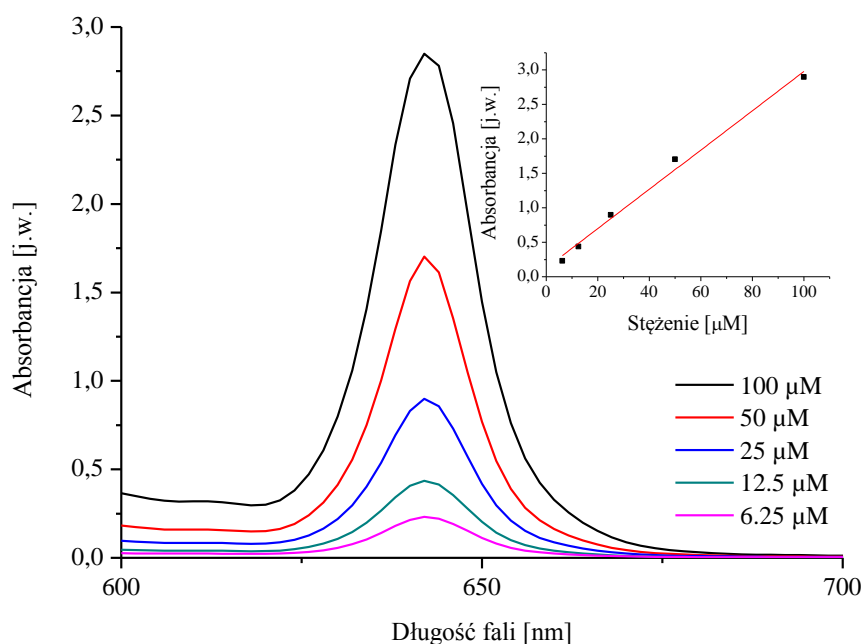
krzywe zależności absorbancji dla ostatniego pasma Q od stężenia fotouczulacza. Zależności te przedstawiono na wykresach 5 – 7.



Wykres 5: Krzywa zależności wartości absorbancji ostatniego pasma Q (640 nm) od stężenia fotouczulacza dla roztworu chl *k* w metanolu.



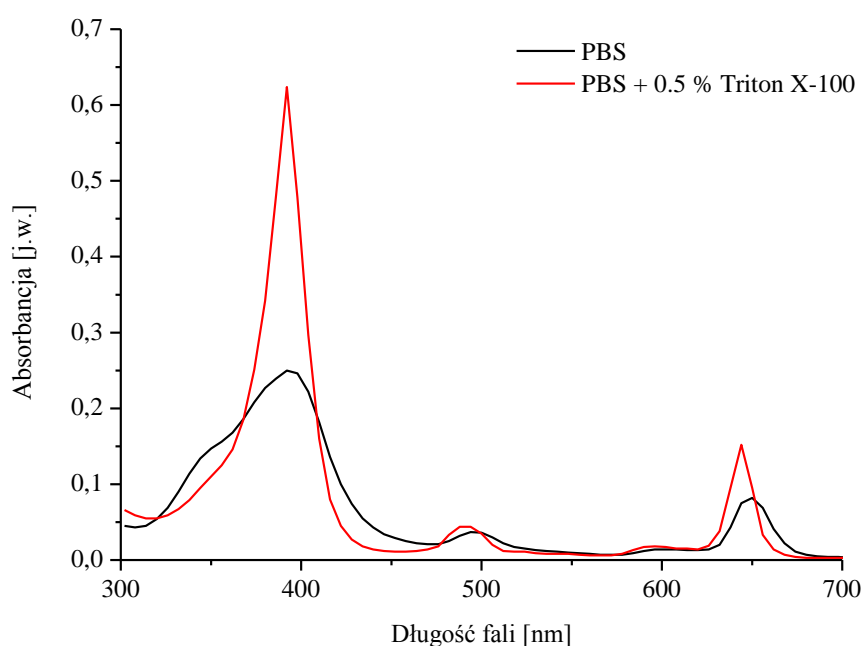
Wykres 6: Krzywa zależności wartości absorbancji ostatniego pasma Q (644 nm) od stężenia fotouczulacza dla roztworu chl *k* w chloroformie.



Wykres 7: Krzywa zależności wartości absorbancji ostatniego pasma Q (642 nm) od stężenia fotouczulacza dla roztworu chl *k* w dimetylosulfotlenku.

Z otrzymanych krzywych wynika, iż podczas rozcieńczeń związek nie ulegał agregacji, o czym świadczy liniowa zależność absorbancji od stężenia fotouczulacza. Nie można jednak wykluczyć, że związek mógł ulec agregacji podczas jego rozpuszczania, natomiast jej stopień nie zmieniał się w trakcie dalszych rozcieńczeń. Ze względu na to, że chl *k* posiada dwa łańcuchy cukrów, które mają za zadanie zwiększyć jej zdolność do rozpuszczania się w środowisku wodnym [24, 118] oraz długi hydrofobowy łańcuch węglowodorowy składający się z 15 atomów węgla, należy sprawdzić, jak będzie się ona zachowywała w roztworach hydrofilowych. W tym celu przeprowadzono pomiar widm absorpcji dla chl *k* rozpuszczonej w samym buforze fosforanowym oraz z dodatkiem niewielkiej ilości surfaktantu (Triton X-100), który zwiększa solubilizację związku w roztworze (Wykres 8). Z zarejestrowanych widm widać, iż po dodaniu surfaktantu zwęża się szerokość poszczególnych pasm oraz rośnie wartość absorbancji, a zatem związek w środowisku wodnym agreguje, co może przekładać się na ograniczenie jego skuteczności w terapii PDT. Jednakże efekt ten można obniżyć poprzez zamknięcie chl *k* w różnego rodzaju nanonośnikach, na przykład w liposomach, dzięki czemu kontakt fotouczulacza ze środowiskiem wodnym zostanie ograniczony. Przykładowo Yang wraz ze współpracownikami charakteryzując właściwości fotofizyczne hematoporfiryny w środowisku wodnym zastosowali nanonośniki – liposomy oraz micle, w celu

uniknięcia agregacji związku w tym środowisku [117]. Porównując widma absorpcyjne otrzymane dla hematoporfiryny w postaci wolnej oraz zamkniętej w nanonośnikach zaobserwowali wzrost intensywności poszczególnych pasm absorpcji oraz ich przesunięcie w kierunku fal dłuższych. Dodatkowo uzyskali wyższe wartości kwantowej wydajności fluorescencji oraz kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego dla kompleksu fotouczulacza z nanonośnikiem. Zatem wykorzystanie miceli oraz liposomów sprzyja monomeryzacji związku i ogranicza jego agregację zmniejszając tym samym prawdopodobieństwo pogorszenia właściwości fotofizycznych fotouczulacza w środowisku wodnym [117]. Podobne badania przeprowadził Lovčinský wraz ze współpracownikami zamykając terafenyloporfiryne (TPP) w nośnikach liposomowych [119]. Wykazali, że właściwości fizykochemiczne tego kompleksu są porównywalne do fotouczulaczy hydrofilowych. Dodatkowo zastosowanie liposomów, jako nośników leków, nie tylko zwiększa selektywność dostarczania fotouczulacza do miejsca docelowego, ale również utrzymuje go w postaci monomerycznej sprzyjającej produkcji tlenu singletowego [119].



Wykres 8: Widma absorpcyjne chl *k* rozpuszczonej w buforze fosforanowym oraz z dodatkiem Tritonu X-100 (stężenie 5 μ M).

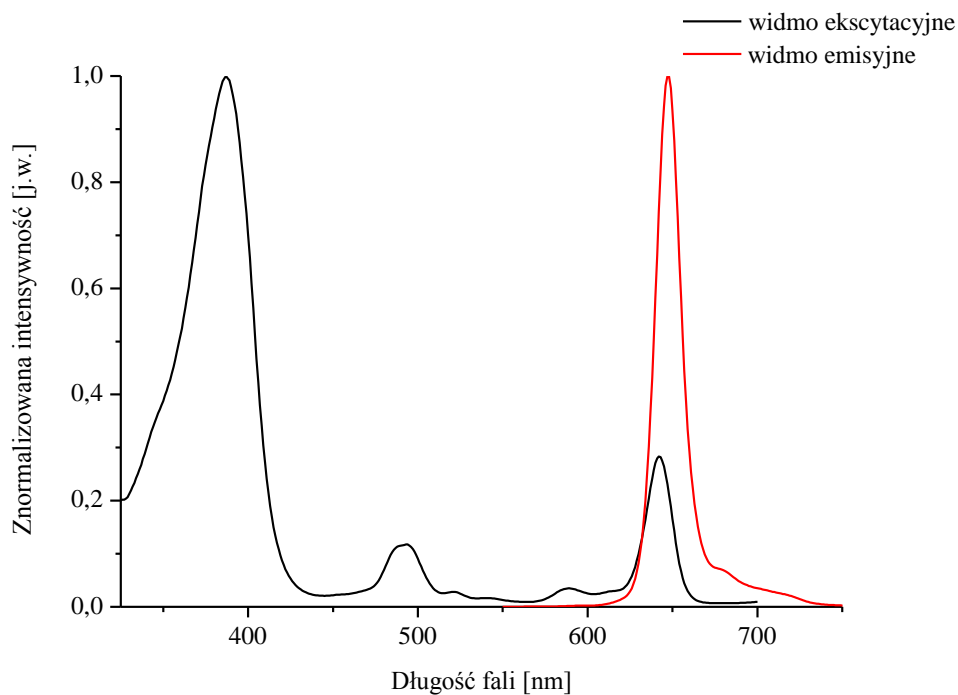
IV. 1. 2. Widma emisyjne oraz ekscytacyjne

Na wykresach 9 – 12 przedstawiono znormalizowane widma fluorescencji oraz ekscytacji uzyskane dla chl *k* w różnych rozpuszczalnikach. W tabeli 8 znajdują się podstawowe parametry otrzymane na podstawie analizy widm emisyjnych i absorpcyjnych.

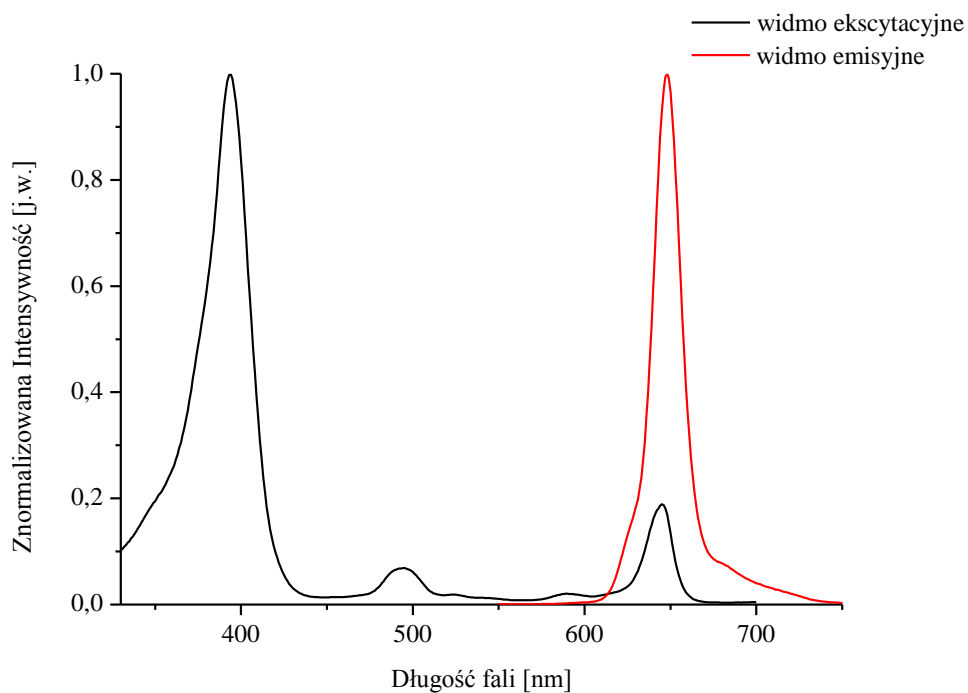
Z zarejestrowanych widm wynika, iż badany fotouczulacz posiada jedno pasmo emisji z maksimum pojawiającym się przy długościach fal od 645 nm do 649 nm w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika. Dodatkowo kształt otrzymanych widm ekscytacyjnych jest podobny do prezentowanych wcześniej widm absorpcyjnych, co potwierdza czystość chemiczną testowanej chloryny.

Przesunięcie Stokesa definiowane, jako różnica pomiędzy maksimum absorpcji ostatniego pasma a maksimum emisji, określa straty energii pomiędzy wzbudzeniem a fluorescencją cząstek w roztworze. Duże wartości przesunięcia Stokesa mogą oznaczać, iż cząsteczka fotouczulacza oddziałuje z rozpuszczalnikiem lub tworzy kompleksy z innymi substancjami i przekazuje im swoją energię wzbudzenia [99]. Uzyskane wartości przesunięcia dla badanego związku w różnych rozpuszczalnikach są niewielkie. Oznacza to, że straty energii pomiędzy wzbudzeniem a fluorescencją cząstek w roztworach są małe oraz sugeruje, iż struktura chloryny w stanie wzbudzonym jest taka sama, jak w stanie podstawowym [120]. Wartości energii stanu singletowego wyznaczono na podstawie przecięcia się znormalizowanych widm emisji oraz absorpcji (Tabela 8) [121].

IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

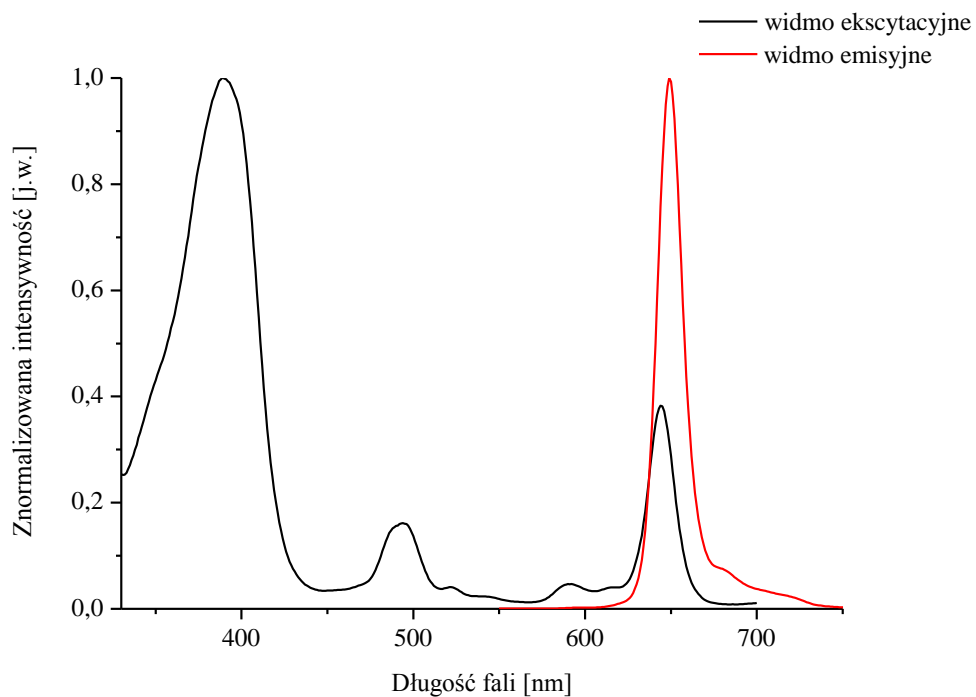


Wykres 9: Znormalizowane widmo ekscytacyjne (648 nm) oraz emisyjne (388 nm) dla roztworu chl *k* o stężeniu 6.25 μM w metanolu.

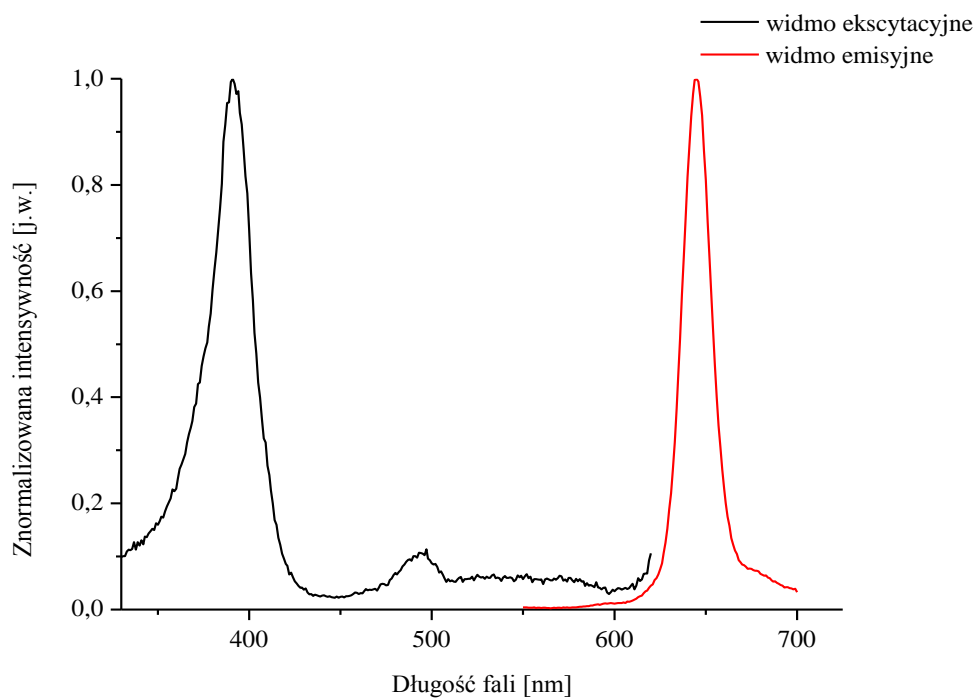


Wykres 10: Znormalizowane widmo ekscytacyjne (648 nm) oraz emisyjne (394 nm) dla roztworu chl *k* o stężeniu 6.25 μM w chloroformie.

IV. ANALIZA I DISKUSJA WYNIKÓW



Wykres 11: Znormalizowane widmo ekscytacyjne (649 nm) oraz emisyjne (392 nm) dla roztworu chl *k* o stężeniu 6.25 μM w dimetylosulfotlenku.



Wykres 12: Znormalizowane widmo ekscytacyjne (645 nm) oraz emisyjne (393 nm) dla roztworu chl *k* o stężeniu 5 μM w glicerynie.

Tabela 8: Położenia pasm emisji i ostatniego pasma Q, wartości przesunięcia Stokesa oraz energii stanu singletowego wyznaczone dla chl *k*.

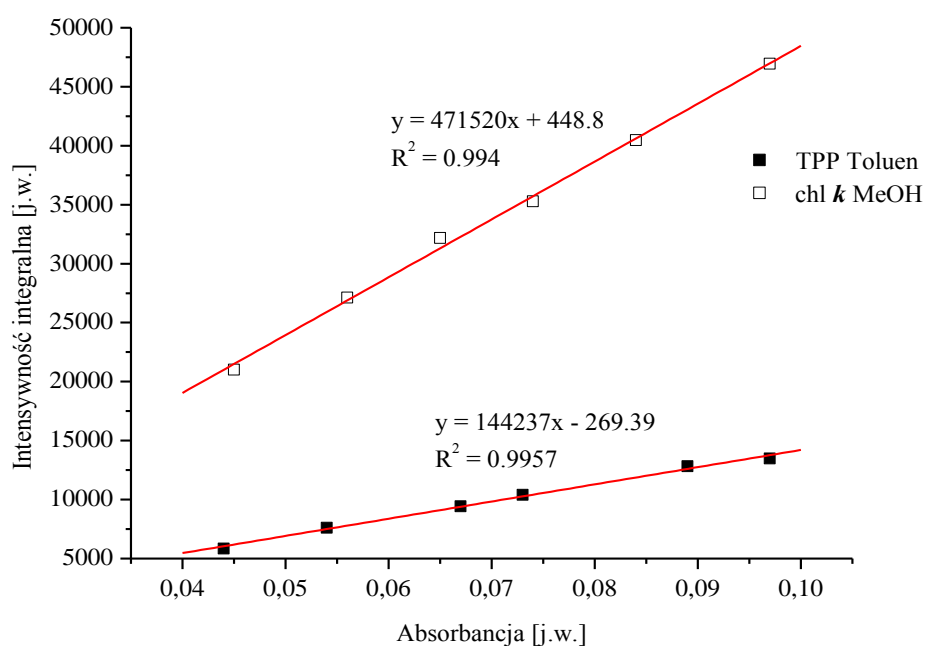
Rozpuszczalnik	Maksimum emisji [nm]	Pasmo Q [nm]	Przesunięcie Stokesa [nm]	Energia stanu singletowego E_s [kJ/mol]
Metanol	648	640	8	184.87
Chloroform	648	644	4	184.87
Dimetylosulfotlenek	649	642	7	184.59
Gliceryna	645	645	0	185.73

IV. 1. 3. Kwantowa wydajność fluorescencji

Wartości kwantowej wydajności fluorescencji badanego związku w różnych rozpuszczalnikach wyznaczono metodą porównawczą opisaną w rozdziale III. 5. 1. 2. Jako wzorzec wykorzystano związek o znanej wartości kwantowej wydajności fluorescencji ($\Phi_{FL(TPP)} = 0.11$ w toluenie). Na wykresach 13 – 16 przedstawiono zależności intensywności integralnej pasma emisji od absorbancji dla wzorca oraz chl *k* wraz z liniowym dopasowaniem, które wykorzystano do wyznaczenia Φ_{FL} . Uzyskane wartości przedstawiono w tabeli 9.

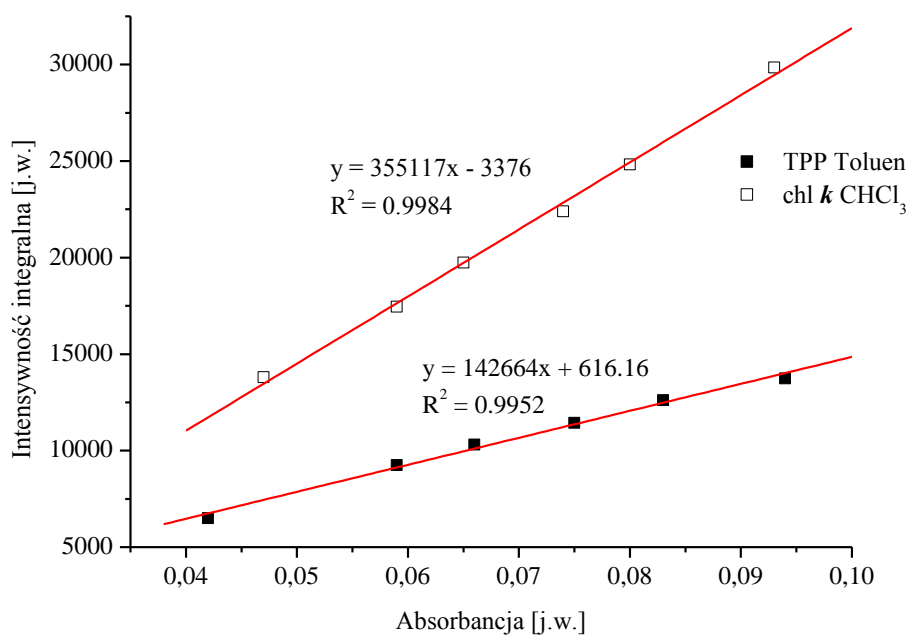
Związek wykorzystywany w terapii fotodynamicznej powinien się charakteryzować niską wartością kwantowej wydajności fluorescencji. Im mniej wzbudzonych cząsteczek fotouczulacza powraca do stanu podstawowego w wyniku emisji fluorescencji, tym prawdopodobnie większa jest wydajność przejść międzysystemowych. W wyniku tych przejść związek znajduje się we wzbudzonym stanie trypletowym i jest zdolny do generowania tlenu singletowego oraz reaktywnych form tlenu. Wartości uzyskane dla chl *k* wynoszą od 3.8 do 40% w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika. Wysokie wartości kwantowej wydajności fluorescencji wynoszące od 25% dla związku rozpuszczonego w chloroformie do 40% w DMSO wcale nie muszą oznaczać, iż fotouczulacz nie będzie wykorzystywany w terapii PDT. Przeprowadzone badania miały, bowiem na celu określenie wpływu różnych środowisk na właściwości fotofizyczne chl *k*, co w kolejnych eksperymentach głównie *in vivo* pozwoli zaplanować, w jakiej formie najlepiej zaaplikować testowany fotouczulacz. Dodatkowo wysoka wartość kwantowej wydajności fluorescencji w niektórych przypadkach może być traktowana jako zaleta, gdyż pozwala na zlokalizowanie zmian nowotworowych, dzięki selektywnemu gromadzeniu się fotouczulacza w tkance

zmienionej chorobowo. Związek ten może być, zatem również wykorzystywany do celów diagnostycznych. Podobne badania prowadził Shubhajt wraz ze współpracownikami oceniając wpływ różnego rodzaju rozpuszczalników na właściwości fizykochemiczne chloryny **e6**. Otrzymane przez nich wartości kwantowej wydajności fluorescencji dla związku rozpuszczonego w metanolu oraz dimetylosulfotleniu wynoszące odpowiednio 70 i 35% będą użyteczne podczas projektowania farmaceutycznej formy chloryny **e6** [116].

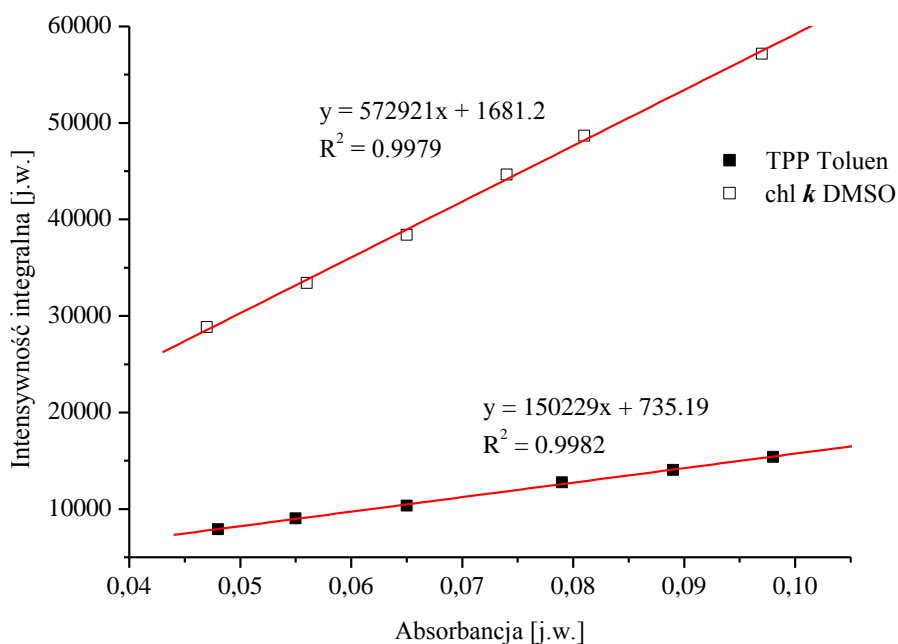


Wykres 13: Zależność intensywności integralnej emisji od absorbancji dla wzorca oraz roztworu chl *k* w metanolu.

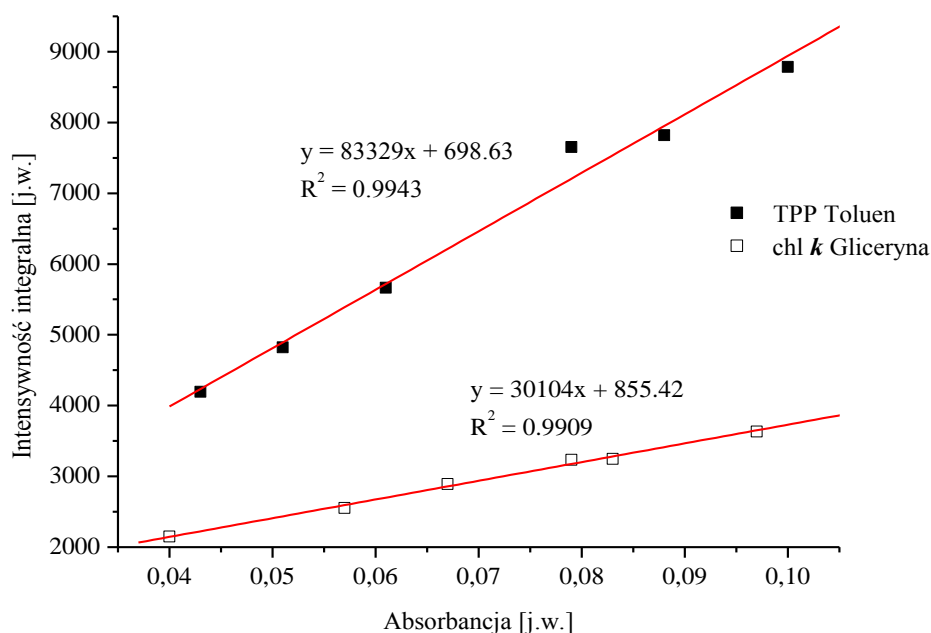
IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW



Wykres 14: Zależność intensywności integralnej emisji od absorpcji dla wzorca oraz roztworu chl *k* w chloroformie.



Wykres 15: Zależność intensywności integralnej emisji od absorpcji dla wzorca oraz roztworu chl *k* w dimetylosulfotlenku.



Wykres 16: Zależność intensywności integralnej emisji od absorbancji dla wzorca oraz roztworu chl *k* w glicerynie.

Tabela 9: Wartości kwantowej wydajności fluorescencji otrzymane dla chl *k*.

Rozpuszczalnik	Kwantowa wydajność fluorescencji $\Phi_{FL} \pm \Delta\Phi_{FL}[-]$
Metanol	0.28 ± 0.02
Chloroform	0.25 ± 0.02
Dimetylosulfotlenek	0.40 ± 0.02
Gliceryna	0.038 ± 0.003

IV. 1. 4. Czas życia fluorescencji

Na podstawie zarejestrowanych krzywych zaniku fluorescencji, otrzymanych metodą TCSPC, wyznaczono czasy życia fluorescencji badanego związku rozpuszczonego w glicerynie. Procedura wykonywania pomiaru została opisana w rozdziale III. 5. 1. 3. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu FluoFit (PicoQuant, GmbH, wersja 4.4). Do krzywych zaniku fluorescencji dopasowano wielowykładniczy model krzywej (7):

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (7)$$

$I(t)$ – intensywność emisji fluorescencji w chwili czasu t ;

α_i – amplituda i -tego składnika w chwili czasu t ;

τ_i – czas życia i -tego elementu.

Intensywność średniej ważonej czasu życia fluorescencji (τ_{avg}) wyznaczono za pomocą poniższego równania (8):

$$\tau_{avg} = \sum_i f_i \tau_i \quad (8)$$

gdzie f_i (9):

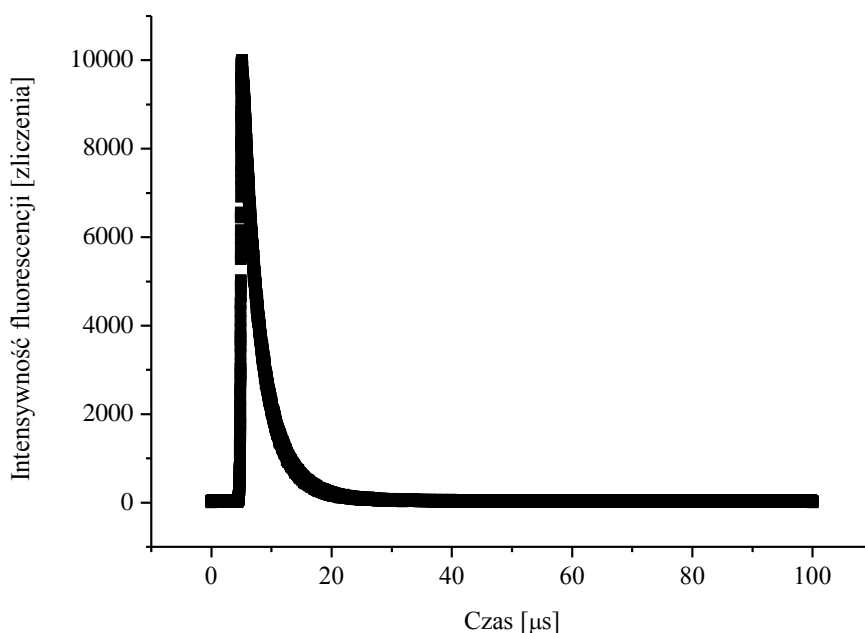
$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (9)$$

Stopień dopasowania modelu do krzywej oszacowano za pomocą parametru χ^2 .

W tabeli 10 przedstawiono otrzymane czasy życia fluorescencji dla roztworu badanej chloryny w glicerynie, natomiast przykładowa krzywa zaniku fluorescencji znajduje się na wykresie 17. Krzywe zaniku fluorescencji rejestrowano dla dwóch długości fal emisji 642 i 670 nm. Testowany związek charakteryzuje się czterema czasami życia fluorescencji. Wśród nich można wyróżnić jeden długi komponent (9.26 ns) oraz 3 krótsze. Przy czym najkrótszy czas życia wynosi 0.09 ns. Obecność więcej niż jednego czasu życia fluorescencji świadczy o tym, iż badany związek występuje w różnych formach. Mianowicie komponent o długim czasie życia związany jest prawdopodobnie, z występowaniem związku w postaci monomerycznej. Krótkie komponenty mogą być natomiast związane z formą oligomeryczną chloryny. Dodatkowo za szybkie czasy życia mogą odpowiadać agregaty, które mogły powstać w trakcie rozpuszczania związku w glicerynie [122].

Tabela 10: Czasy życia fluorescencji uzyskane dla roztworu chl *k* w glicerynie.

Exc [nm]	Ems [nm]	$\tau_1 =$ 9.26 ns	$\tau_2 =$ 4.25 ns	$\tau_3 =$ 1.30 ns	$\tau_4 =$ 0.09 ns	$\langle \tau \rangle_{int}$	$\langle \tau \rangle_{amp}$	χ^2
		α_1	α_2	α_3	α_4			
480	642	0.12	0.81	0.06	0.01	4.68	2.98	0.99
480	670	0.12	0.56	0.22	0.1	3.75	0.67	0.99



Wykres 17: Przykładowa krzywa zaniku fluorescencji roztworu chl *k* w glicerynie, zarejestrowana przy długości fali 670 nm.

Metody pomiaru czasu życia fluorescencji są bardzo czułymi technikami, które pozwalają nie tylko określić miejsce gromadzenia się fotouczulacza w tkance nowotworowej, ale również są czułe na zmianę właściwości tkanek. Szereg biomolekuł naturalnie występujących w organizmie ludzkim takich jak aminokwasy, białka, czy lipidy posiada zdolność emisji po wzbudzeniu światłem widzialnym bądź z zakresu ultrafioletu. W związku, z tym faktem analizując długości czasów życia fluorescencji istnieje możliwość ich rozróżnienia [7, 123]. Dodatkowo zmiana nowotworowa może powodować pojawienie się nowych fluoroforów albo zmienić koncentrację fluoroforów naturalnie występujących w zdrowej komórce. Powyższe czynniki powodują, iż metoda pomiaru czasów życia fluorescencji jest przydatnym narzędziem w medycynie. Zmiany średnich czasów życia poszczególnych endogennych fluoroforów mogą świadczyć o patologii tkanek. Pozwala to między innymi określić, iż w komórce nastąpiła transformacja nowotworowa. Technika ta może być również wykorzystywana w standardowych badaniach klinicznych do wykrywania guzów i płytek miażdżycowych, czy też w testach immunofluorescencyjnych do diagnozy toksoplazmozy [7, 124]. Dodatkowo metody detekcji fluorescencji są mało inwazyjne i stosunkowo niedrogie w porównaniu do innych sposobów diagnozowania zmian w organizmie ludzkim. Można

ją z łatwością zastosować do różnych części ciała ludzkiego pod warunkiem, że w miejsce to zostanie dostarczone światło w sposób bezpośredni lub za pomocą endoskopu [124].

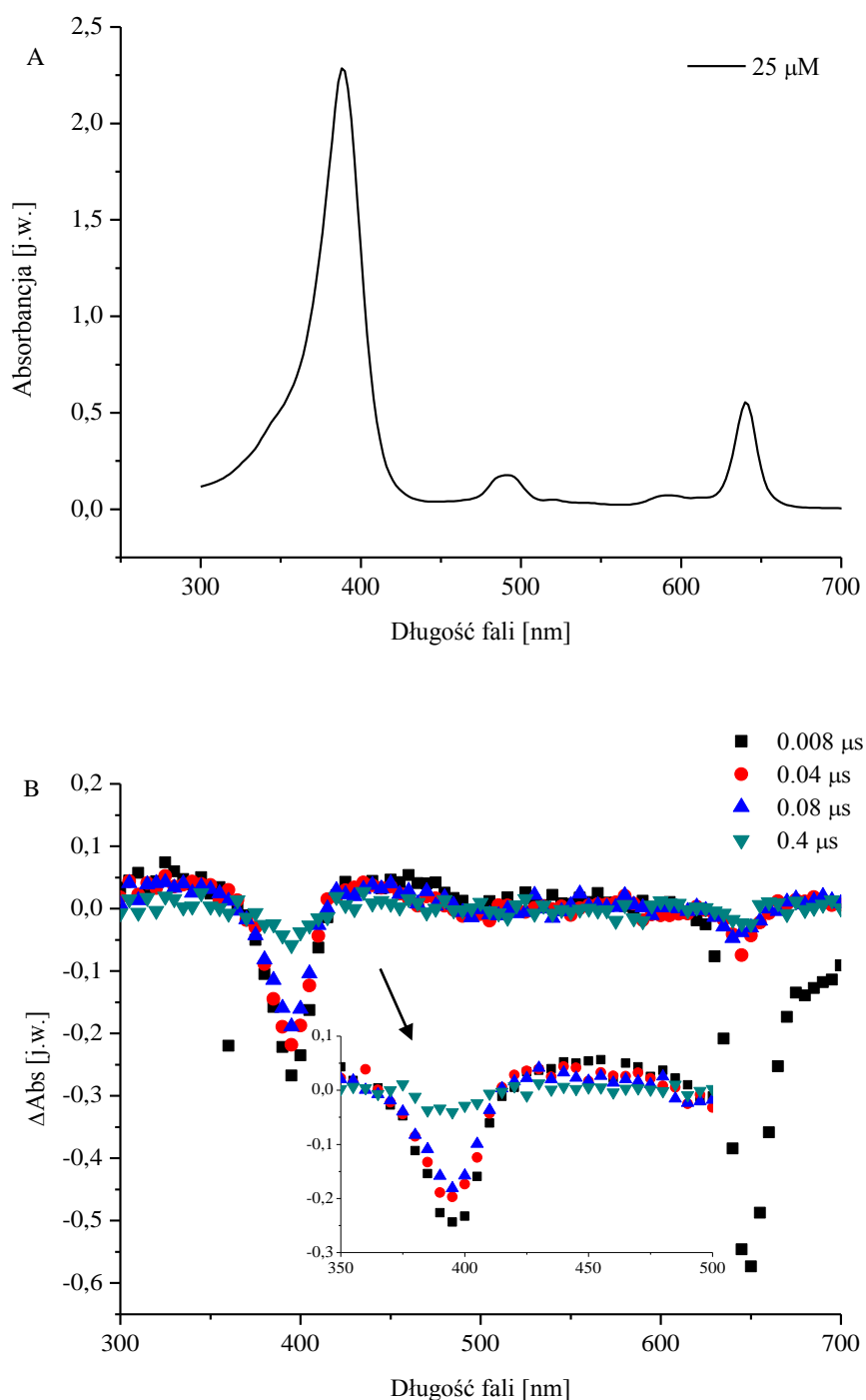
Menezes wraz ze współpracownikami w swojej pracy przeprowadził pomiary czasów życia fluorescencji nowych fotouczulaczy będących pochodnymi chloryny *e6* oraz protoporfiryny IX [125]. Badanie to stanowiło jedno z podstawowych eksperymentów przeprowadzanych podczas charakterystyki fizykochemicznej nowych fotouczulaczy, które mogą być wykorzystywane w terapii fotodynamicznej. Pozwoliło ono określić, czy fluorescencja testowanych związków w trakcie przeprowadzania leczenia, czy też diagnozy będzie rozróżnialna od autofluorescencji tkanek [125]. Innym przykładem wykorzystania czasów życia fluorescencji fotouczulaczy jest praca Shu-Chi Allison Yeh [126]. Autorka wraz ze współpracownikami przeprowadziła badania potwierdzające zmianę czasu życia fluorescencji dla Photofrinu w zależności od jego lokalizacji w komórkach nowotworowych. Eksperymenty przeprowadzono na linii komórkowej MLL (szczurzy rak prostaty). Do określenia miejsca gromadzenia się leku w komponentach komórki wykorzystali mikroskop konfokalny, natomiast do śledzenia zmian czasów życia fluorescencji *in vitro* technikę mikroskopowego obrazowania czasów życia FLIM (z ang. fluorescence lifetime imaging microscopy). Na podstawie otrzymanych zdjęć z mikroskopu konfokalnego określili, że Photofrin w pierwszej kolejności gromadzi się w błonie komórkowej, następnie w cytoplazmie i w efekcie końcowym w mitochondrium. Badany fotouczulacz charakteryzował się czasem życia złożonym z dwóch komponentów. Czas życia szybkiego komponentu wynosił od 0.3 – 1.0 ns. Natomiast drugi w zależności od miejsca lokalizacji w komórce wynosił: 4.3 ± 0.5 ns (błona komórkowa), 7.3 ± 0.3 ns (cytoplazma) oraz 7.0 ± 0.2 ns (mitochondrium) [126].

IV. 1. 5. Czas życia molekuł w stanie trypletowym

Czas życia molekuł fotouczulacza w stanie trypletowym jest istotnym parametrem przy fizykochemicznej charakterystyce potencjalnych leków, które mogą zostać wykorzystane w terapii fotodynamicznej. Mianowicie im dłuższy czas życia tym większe prawdopodobieństwo, że molekuły fotouczulacza w stanie trypletowym prześlą energię cząsteczką tlenu molekularnego w wyniku, czego powstanie silnie toksyczny tlen

singletowy. Do określenia czasu życia molekuł w stanie trypletowym wykorzystano technikę laserowej fotolizy błyskowej (rozdział III. 5. 1. 4. 1).

Widmo absorpcji przejściowej tryplet-tryplet otrzymane dla chl *k* przedstawiono na wykresie 18. Widoczne są na nim obszary dodatnie związane z przejściem cząsteczek do wzbudzonego stanu trypletowego oraz obszary ujemne, za które odpowiedzialne jest zjawisko deplecji, czyli zubożenie liczby cząsteczek fotouczulacza w stanie podstawowym w wyniku przejść singlet-singlet [127].



Wykres 18: Widmo absorpcji (A) oraz widmo absorpcji przejściowej tryplet-tryplet (B) zarejestrowane w różnych czasach od momentu wzbudzenia impulsem lasera o długości fali 355 nm dla roztworu chl *k* w metanolu.

Na podstawie otrzymanego widma absorpcji przejściowej wyznaczono długość fali (436 nm), przy której rejestrowane były kinetyczne krzywe zaniku absorpcji zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III. 5. 1. 4. 1. Przykładowe krzywe zaniku absorpcji dla

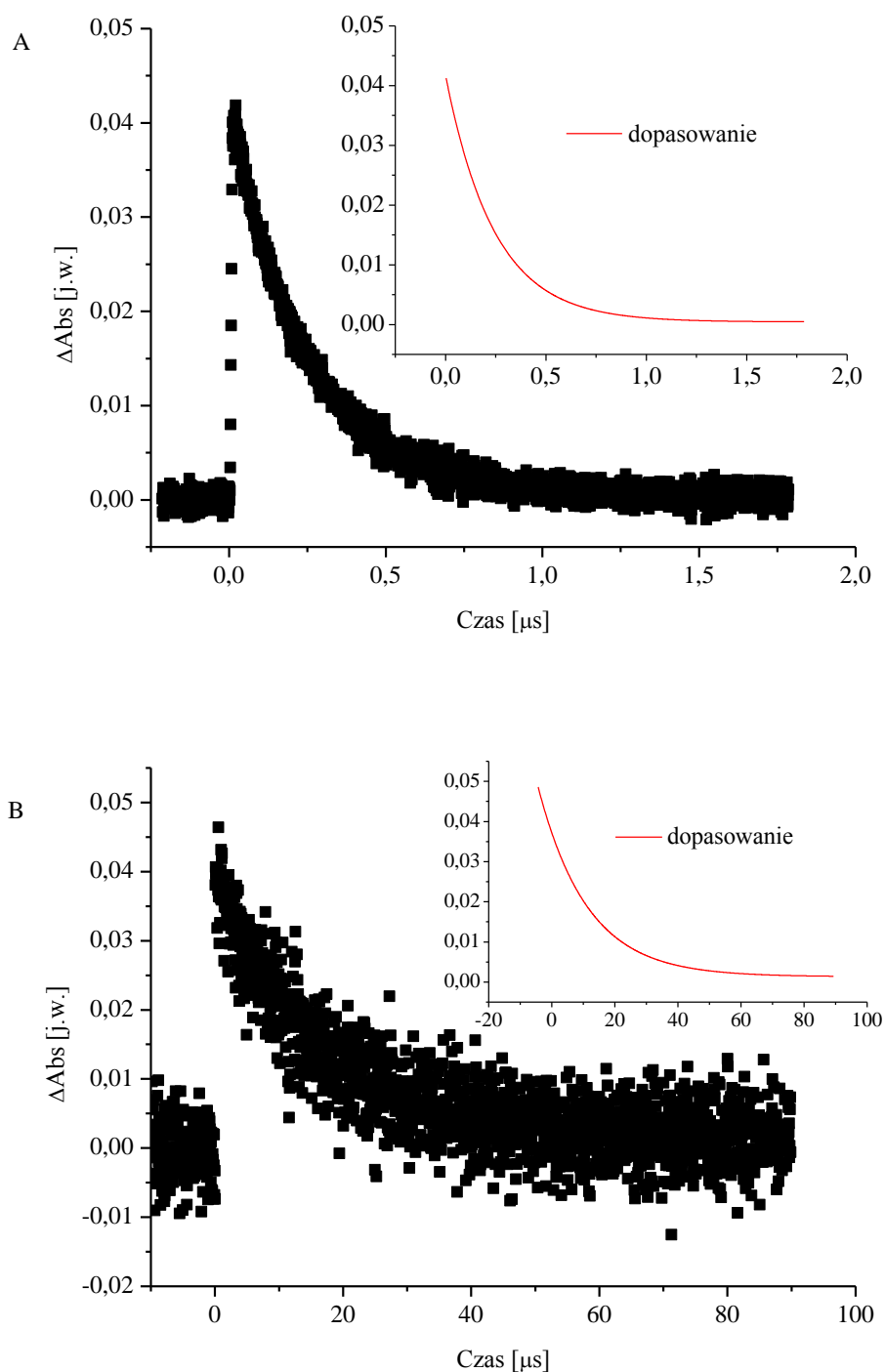
IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

badanego związku w warunkach tlenowych i zbliżonych do beztlenowych przedstawiono na wykresie 19. Ze względu na to, że krzywe te mają charakter wykładniczy dopasowano do nich krzywe eksponentialne opisane równaniem (10), gdzie k jest stałą szybkości zaniku stanu trypletowego, a jej odwrotność pozwala wyznaczyć czas życia wzbudzonych molekuł fotouczulacza w tym stanie (11):

$$y = a^{(-kx)} + c \quad (10)$$

$$\tau_T = \frac{1}{k} \quad (11)$$

τ_T – czas życia wzbudzonej molekuly fotouczulacza w stanie trypletowym.



Wykres 19: Kinetyczne krzywe zaniku absorpcji wraz z dopasowaniem zarejestrowane dla chl *k* w środowisku tlenowym (A) oraz zbliżonym do beztlenowego (B).

W tabeli 11 zamieszczono średnie czasy życia molekuł fotouczulacza w stanie trypletowym wraz z ich odchyleniem standardowym oraz stałą szybkości wygaszania stanów trypletowych k_q wyznaczoną na podstawie równania Sterna-Volmera (rozdział

III. 5. 1. 4. 1.). Stężenie tlenu w wykorzystanym do badań rozpuszczalniku wynosiło 2.1 mM [96].

Tabela 11: Średnie czasy życia molekuł fotouczulacza w stanie trypletowych oraz stała szybkości wygaszania dla roztworu chl *k* w metanolu.

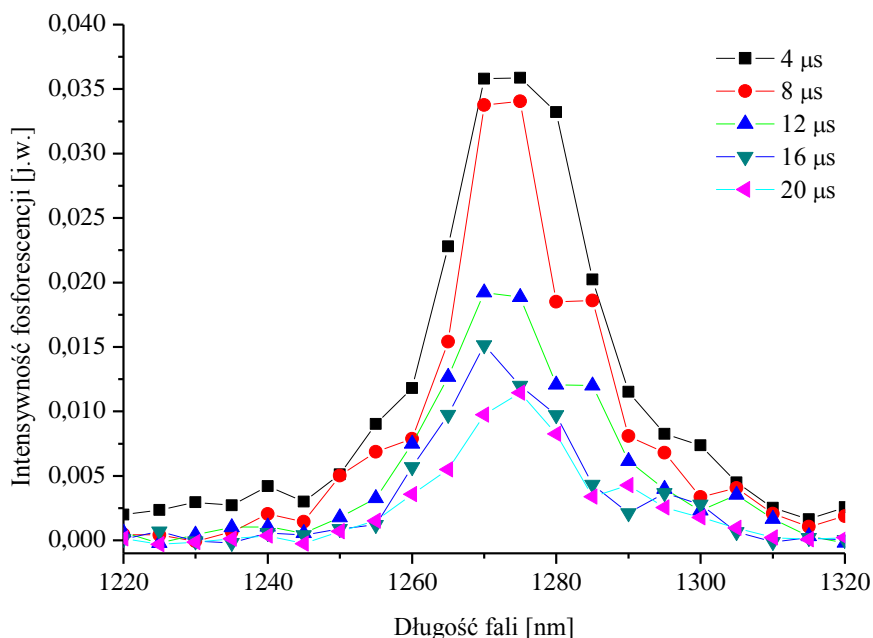
$\tau_{T,O_2} \pm \Delta\tau_{T,O_2} [\mu s]$	$\tau_{T,N_2} \pm \Delta\tau_{T,N_2} [\mu s]$	$k_q [M^{-1} \cdot s^{-1}]$
0.27 ± 0.02	14.51 ± 0.89	$1.7 \cdot 10^9$

Czas życia cząsteczek w stanie trypletowym w warunkach zbliżonych do beztlenowych jest o ponad pięćdziesiąt razy dłuższy od czasu życia w warunkach równowagi z otoczeniem. Związane jest to z faktem, iż tlen jest wygaszaczem stanów trypletowych. Podobną tendencję otrzymała Nowak-Śliwińska wraz ze współpracownikami prowadząc badania nad wykorzystaniem fotouczulaczy do leczenia czerniaka metodą terapii fotodynamicznej [128]. Uzyskane przez nich czasy życia cząsteczek w stanie trypletowym dla Werteporfiryny oraz Photofrinu rozpuszczonych w metanolu wynosiły odpowiednio 0.15 i 0.29 μs w warunkach równowagi z otoczeniem oraz 23.1 i 92 μs w warunkach beztlenowych [128]. Kolejnym przykładem, dla którego czasy życia w metanolu wynoszą 0.27 oraz 100 μs , odpowiednio w warunkach tlenowych i beztlenowych jest Foscan [129]. Widoczne różnice w czasach życia cząsteczek fotouczulaczy w warunkach beztlenowych badanej chloryny i związków podanych w literaturze wynikają prawdopodobnie z nieszczelności stosowanego układu do odtlenowywania próbki. Porównując jednak otrzymane wyniki do tych uzyskanych przez Nowak-Śliwińską oraz Dąbrowskiego dla związków komercyjnych wynika, iż badany fotouczulacz posiada relatywnie długi czas życia wystarczający do generowania odpowiedniej ilości tlenu singletowego. Chl *k* może być, zatem rozpatrywana, jako potencjalny lek przeciwnowotworowy w terapii PDT niszczący komórki w wyniku reakcji zachodzących w mechanizmie typu II [128].

IV. 1. 6. Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego

Do wyznaczenia kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego (Φ_Δ), przez badany związek, wykorzystano metodę porównawczą opisaną w rozdziale III. 5. 1. 4. 2. Jako wzorzec wykorzystano fenalenon, gdyż wydajność generowania przez

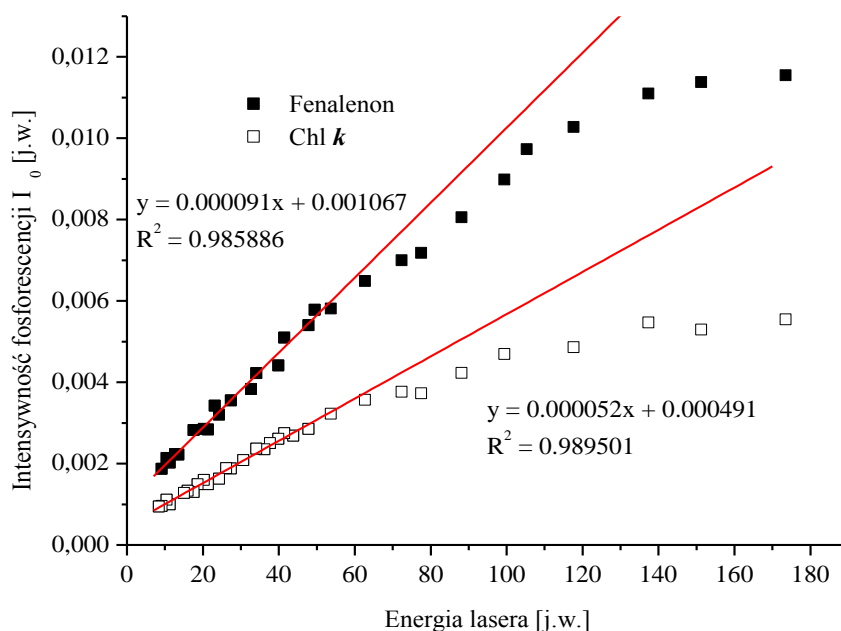
niego tlenu singletowego jest w przybliżeniu równa jedności (0.97) [108]. Zarejestrowane widmo emisyjne dla badanego związku przedstawiono na wykresie 20. Widoczne jest na nim charakterystyczne dla fosforescencji tlenu singletowego pasmo z maksimum emisji przy długości fali około 1270 nm.



Wykres 20: Widmo fosforescencji tlenu singletowego zarejestrowane dla roztworu chl *k* w metanolu przy różnych czasach od momentu wzbudzenia impulsem laserowym o długości fali 355 nm.

W kolejnym etapie eksperymentu zarówno dla wzorca, jak i badanej próbki zarejestrowano kinetyczne krzywe zaniku fosforescencji przy długości fali 1270 nm dla różnych energii impulsu wzбудzającego. Do wszystkich uzyskanych krzywych zaniku dopasowano funkcje monoeksponencjalne, w celu wyznaczenia wartości intensywności fosforescencji w chwili czasu $t = 0$. Następnie wykreślono krzywe zależności intensywności emisji I_0 ($t = 0$) od energii wzbudzenia lasera (Wykres 21) i zgodnie ze wzorem (4) opisanym w rozdziale III. 5. 1. 4. 2. wyznaczono kwantową wydajność generowania tlenu singletowego przez badany związek. Jednakże ze względu na nieliniowy przebieg tej zależności przy wyższych energiach do wyznaczenia Φ_{Δ} wykorzystano zakres liniowy. Efekt ten może być związany z wyczerpaniem się cząsteczek w stanie podstawowym [130]. W tabeli 12 przedstawiono otrzymaną wartości Φ_{Δ} dla chl *k* oraz w celu porównania zamieszczono kwantowe wydajności generowania

tlenu singletowego uzyskane dla związków wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej.



Wykres 21: Krzywe zależności intensywności fosforescencji w chwili czasu $t = 0$ od energii lasera dla fenalenonu oraz chl *k*.

Tabela 12: Kwantowe wydajności generowania tlenu singletowego dla różnych związków rozpuszczonych w metanolu (^a [131], ^b [128]).

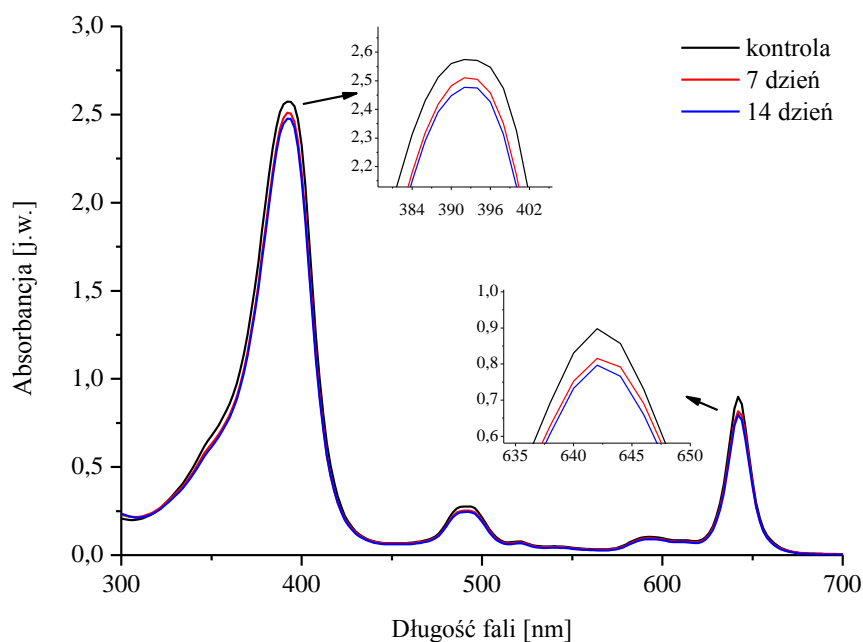
Związek	Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego Φ_{Δ} [-]
Chl <i>k</i>	0.55 ± 0.03
Foscan ^a	0.43
Photofrin ^b	0.35

Tlen singletowy jest jednym z najważniejszych fotoproduktów prowadzących do śmierci komórek nowotworowych. Powstaje on w wyniku reakcji chemicznych zachodzących po wzbudzeniu fotouczulacza światłem o odpowiedniej długości fali. Jego zasięg działania zależy od czasu życia tlenu singletowego w danym środowisku. W metanolu czas wyznaczony z kinetycznej krzywej zaniku fosforescencji tlenu wynosi 10.1 μ s, co jest zgodne z danymi literaturowymi (9 – 11.4 μ s) [132-134]. Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej wartość kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego powinna być, zatem jak najwyższa. Fotouczulacze będące obecnie w fazie badań klinicznych charakteryzują się wydajnością generowania tlenu singletowego

wynoszącą od 0.1 do 1. Wartości te zależą od zastosowanego rozpuszczalnika [135]. Porównując Φ_{Δ} otrzymaną dla chl k z komercyjnymi związkami aktualnie wykorzystywanymi w PDT (Tabela 12), wynika, iż testowany związek jest potencjalnym kandydatem do zastosowania go, jako lek przeciwnowotworowy w tej technice leczenia.

IV. 1. 7. Stabilność i fotodegradacja

Fotouczulacze to związki, które zmieniają swoje właściwości fizykochemiczne pod wpływem światła. Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej należy sprawdzić, czy potencjalny lek podczas przechowywania w miejscu zaciemnionym o ograniczonym dostępie światła nie zmienia swoich parametrów fotofizycznych. W tym celu wykonano pomiar widm absorpcyjnych po 7 i 14 dniach od momentu sporządzenia roztworu. Na wykresie 22 zestawiono otrzymane widma wraz z widmem kontrolnym (widmo zarejestrowane zaraz po sporządzeniu roztworu przed umieszczeniem go w zaciemnionym miejscu). Z porównania wartości absorbancji odczytanej dla maksimum absorpcji w paśmie Soreta i ostatniego pasma Q wynika, iż w pierwszym tygodniu spada ona o 2.4% oraz 9.1% odpowiednio dla tych pasm. W następnym tygodniu wartość ta zmniejsza się nieznacznie o 1.4% dla pasma Soreta oraz o 2.3% dla ostatniego pasma Q. Ze względu na niewielkie zmiany absorbancji można uznać badany związek za stabilny podczas jego przechowywania w warunkach ograniczonego dostępu światła.



Wykres 22: Widmo absorpcji roztworu chl *k* w dimetylosulfotlenku zarejestrowane po różnych czasach od momentu przygotowania próbki (stężenie związku – 25 μM).

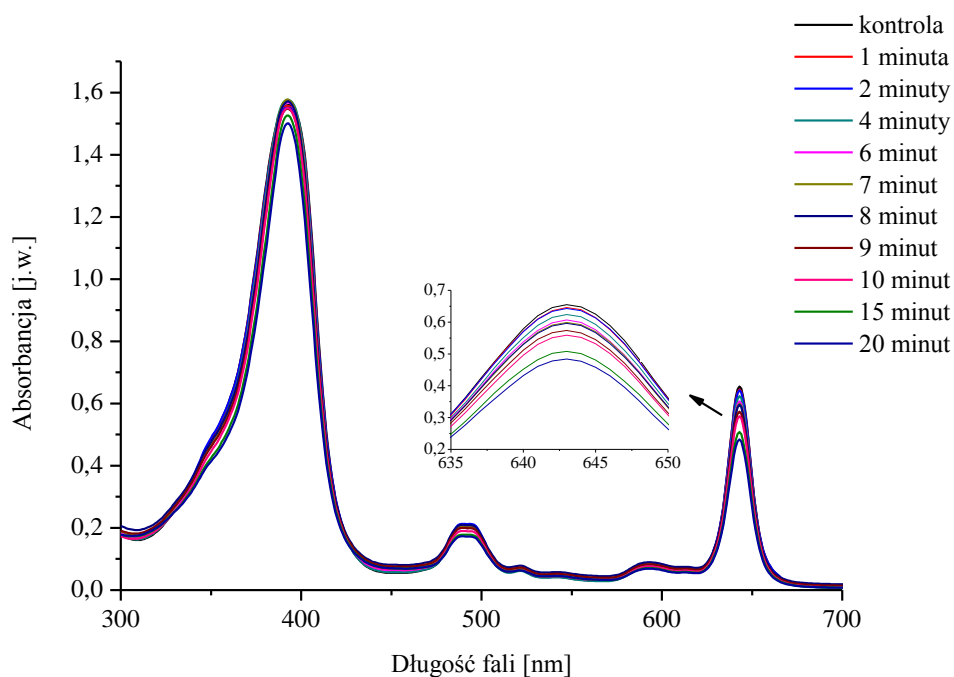
W kolejnym etapie eksperymentu zbadano wpływ światła czerwonego na właściwości fotofizyczne badanego związku. Na wykresie 23 przedstawiono widma absorpcji chl *k* wykonywane przy różnych czasach naświetlań związku.

Większość fotouczulaczy ulega fotodegradacji podczas ich naświetlania. Proces ten nazywa się fotowysieleniem i można go zdefiniować, jako utratę przez związek zdolności do pochłaniania lub emitowania fotonów w wyniku działania na nie światła. Ważna jest, zatem ocena stopnia fotowysielenia testowanych związków, gdyż zbyt szybkie fotowysielenie skutkuje obniżeniem efektywności terapii fotodynamicznej. Można wyróżnić dwa typy fotowysielenia. Pierwszy z nich to fotomodifikacja związana ze zmianą formy chromoforu pod względem chemicznym i powstaniem nowych pasm w zakresie widzialnym widma. W trakcie tego procesu nie następuje rozerwanie molekuly. Drugi proces nazywany jest prawdziwym fotowysieleniem i charakteryzuje się spadkiem wartości absorbancji w wyniku fragmentacji fotouczulacza [31, 136].

Analizując zarejestrowane widma (Wykres 23) nie zaobserwowano pojawienia się dodatkowych pasm świadczących o powstaniu fotoproduktów. Wartości absorbancji poszczególnych pasm absorpcji maleją, co również świadczy o tym, iż nie powstały żadne fotoprodukty, które mogłyby absorbować światło przy tych samych długościach fali, co badany związek. Jednakże niewielki wzrost absorbancji zaobserwowano

IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

w zakresie spektralnym od 440 do 480 nm. Prawdopodobnie efekt ten związany jest z fotomodyfikacją fotouczulacza. Istnieje wiele danych literaturowych, w których zaobserwowano wzrost absorbancji w zakresie widzialnym od 450 do 500 nm po naświetleniu roztworów porfiryn oraz chloryn, co sugeruje, iż mogły powstać te same fotoprodukty [31, 137, 138].



Wykres 23: Widma absorpcji roztworu chl *k* w dimetylosulfotlenku (20 μM) zarejestrowane po różnych czasach naświetlań związku.

W terapii fotodynamicznej najbardziej interesujące są zmiany absorbancji ostatniego pasma Q. W tabeli 13 przedstawiono procentową zmianę absorbancji po naświetleniach różnymi dawkami światła. Niewielki spadek w zakresie od 1 do 9% zaobserwowano w pierwszych minutach naświetlań (od 1 do 8 minut). Przy dłuższych czasach wartość absorbancji zmienia się o ponad 10%, a w efekcie końcowym po 20 minutach naświetlania (dawka światła 45.6 J/cm^2) maleje aż o 26%. Najmniejszy efekt fotowysbielenia zaobserwowano dla dawek światła od 2 do 18 J/cm^2 , co sugeruje, że badany związek w tym przedziale będzie charakteryzował się największą skutecznością niszczenia komórek nowotworowych.

Fotostabilność fotouczulaczy wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej może być zarówno zaletą jak i wadą. Zbyt szybkie fotowysbielenie związku spowoduje niekompletne zniszczenie guza. Jednakże z drugiej strony przy zastosowaniu fotouczulacza w odpowiedniej dawce terapeutycznej oraz o odpowiedniej stałej

szybkości fotowysbielania można ograniczyć efekt uszkodzania zdrowych tkanek otaczających guzy nowotworowe. Dodatkowo przy zastosowaniu takiego fotouczulacza można by wyeliminować nadwrażliwość skóry pacjentów poddanych terapii PDT na światło [139]. Prowadzone są liczne badania mające na celu określić stopień fotodegradacji związku w zależności od środowiska, w którym się on znajduje. Das wraz ze współpracownikami badał proces fotowysbielania chloryny **p6** w zależności od środowiska [137]. Zaobserwował, iż proces fotowysbielania roztworu chloryny **p6** w buforze fosforanowym oraz chloryny zamkniętej w liposomach zawieszonych również w tym samym buforze jest podobny. Natomiast związek rozpuszczony w buforze z dodatkiem 10% FBS – płodowej surowicy bydlęcej (z ang. foetal bovine serum), ulega fotowysbieleniu trzykrotnie szybciej. Efekt ten może być związany z agregacją związku w dwuwarstwie fosfolipidowej przez co nie jest on efektywnie wysbielany oraz z redukcją ruchliwości dyfuzyjnej leku, kiedy jest on związany z białkami surowicy. W celu określenia, który z mechanizmów (typu I lub II) jest odpowiedzialny za fotowysbielenie, do roztworu chloryny **p6** z FBS dodano histydynę i mannitol. Związki te są odpowiednio wygaszczaczami tlenu singletowego (mechanizm typu II) lub wolnych rodników (mechanizm typu I). Zauważono, iż po dodaniu histydyny szybkość fotodegradacji związku ulega redukcji, natomiast dodanie mannitolu nie miało wpływu na jej przebieg. Sugeruje to, iż fotowysbielenie chloryny **p6** może zachodzić w wyniku mechanizmu typu II [137]. Podobne zależności opisał Hadjur wraz ze współpracownikami badając wpływ światła na meta(tetrahydroksyfenolo)chlorynę (m-THPC) rozpuszczoną w środowisku wodnym z 10% FCS – płodowej surowicy cielęcej (z ang. foetal calf serum). Zaobserwowali oni silną zależność pomiędzy stężeniem tlenu w środowisku a fotodegradacją. Dodanie do roztworu fotouczulacza wygaszczaczy wolnych rodników takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza czy chelator żelaza – deferoksamina nie wpływa na szybkość procesu fotowysbielania, podczas gdy dodanie wygaszczaczy tlenu singletowego (histydyna, 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan – DABCO) znacznie hamuje fotodegradację związku [139]. Szybkość fotowysbielania zależy prawdopodobnie również od typu rozpuszczalnika. Efekt ten nie jest jeszcze do końca wyjaśniony, jednakże rozpuszczalniki polarne mają tendencję do stabilizacji stanów przejściowych, które uczestniczą w reakcjach generowania tlenu singletowego oraz reaktywnych form tlenu. Al-Khaza'leh ze współpracownikami w swojej pracy na temat fotowysbielania fotouczulaczy badał między innymi wpływ polarności rozpuszczalnika na badany związek. Testowany przez nich fotouczulacz miał charakter amfifilowy i był lepiej

rozpuszczalny w środowisku polarnym niż niepolarnym. Zaobserwowali, że proces fotodegradacji przebiega znacznie szybciej dla roztworu związku z 10% FBS niż dla związku rozpuszczonego w buforze fosforanowym, czy też w buforze z 1% BSA – albuminy surowicy bydlęcej (z ang. bovine serum albumin). Prawdopodobnie jest to związane z redukcją ruchliwości dyfuzyjnej leku, przez co może on efektywniej oddziaływać z tlenem singletowym i prowadzić do szybszego fotowysbielenia związku. Podobnie obserwacje poczynili inni badacze [137, 139]. Zaobserwowali, iż po dodaniu wygaszaczy tlenu singletowego szybkość procesu fotowysbielenia ulega redukcji, co świadczy prawdopodobnie o tym, że mechanizm typu II jest odpowiedzialny za degradację związku podczas jego naświetlania [31].

Tabela 13: Czasy naświetlania, dawki światła oraz wartości absorbancji odczytane dla ostatniego pasma Q – 642 nm badanego związku.

Czas [min]	Dawka [J/cm^2]	A_t [-]	A_t/A_0 [%]
0	0	0.646	100.00
1	2.28	0.636	98.45
2	4.56	0.634	98.14
4	9.12	0.615	95.20
6	13.68	0.598	92.57
7	15.96	0.591	91.49
8	18.24	0.588	91.02
9	20.52	0.567	87.77
10	22.8	0.551	85.29
15	34.2	0.502	77.71
20	45.6	0.478	73.99

A_t – absorbancja po czasie naświetlania t ;
 A_0 – absorbancja odczytana dla próbki kontrolnej.

IV. 2. Charakterystyka nośników liposomowych

IV. 2. 1. Średnica liposomów

W pierwszym etapie badań nad wykorzystaniem nośników liposomowych do transportu leków przeciwnowotworowych w terapii fotodynamicznej określono ich średnicę oraz wartości współczynnika polidispersyjności PDI (z ang. polydispersity index). Do tego celu wykorzystano analizator wielkości cząstek Zetasizer Nano ZS

(rozdział III. 5. 2. 1.). W tabeli 14 przedstawiono uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowych otrzymane dla testowanych typów liposomów.

Tabela 14: Wartości średnicy oraz współczynnika polidispersyjności dla badanych liposomów.

Typ liposomu	Średnica $d \pm \Delta d$ [nm]	Współczynnik polidispersyjności $PDI \pm \Delta PDI$ [-]
HSPC/Chol (7:3) puste	140.7 ± 0.23	0.074 ± 0.005
HSPC/DSPE-PEG 2000 (9.5:0.5) puste	118.3 ± 0.36	0.068 ± 0.004
HSPC/DOTAP/Chol (6:1:3) puste	152.8 ± 0.50	0.056 ± 0.007
HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5) puste	119.9 ± 0.35	0.049 ± 0.012
DPPC/DPPG (9:1) puste	125.0 ± 0.71	0.082 ± 0.005
HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5) puste	116.3 ± 0.35	0.064 ± 0.008
HSPC/Chol (7:3) z chl <i>e</i>	142.9 ± 1.65	0.089 ± 0.006
HSPC/DSPE-PEG 2000 (9.5:0.5) z chl <i>e</i>	126.6 ± 0.45	0.116 ± 0.013
HSPC/DOTAP/Chol (6:1:3) z chl <i>e</i>	160.9 ± 1.29	0.093 ± 0.014
HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5) z chl <i>e</i>	126.0 ± 0.47	0.133 ± 0.022
DPPC/DPPG (9:1) z chl <i>e</i>	123.1 ± 0.91	0.068 ± 0.008
HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5) z chl <i>e</i>	124.5 ± 0.38	0.111 ± 0.006
HSPC/Chol (7:3) z chl <i>c</i>	126.9 ± 0.45	0.065 ± 0.008
HSPC/DSPE-PEG 2000 (9.5:0.5) z chl <i>c</i>	114.3 ± 0.50	0.075 ± 0.010
HSPC/DOTAP/Chol (6:1:3) z chl <i>c</i>	128.9 ± 0.53	0.059 ± 0.009
HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5) z chl <i>c</i>	111.0 ± 0.81	0.059 ± 0.001
DPPC/DPPG (9:1) z chl <i>c</i>	111.9 ± 0.83	0.078 ± 0.006
HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5) z chl <i>c</i>	113.3 ± 0.23	0.100 ± 0.006
DPPC/DPPG (9:1) z chl <i>k</i>	118.4 ± 0.38	0.083 ± 0.011

Porównując otrzymane wartości średnic pomiędzy różnymi typami pustych liposomów zaobserwowano pewną zależność. Mianowicie najmniejszy rozmiar posiadają liposomy w skład, których wchodzi glikol polietylenowy. Średnica tych liposomów nie przekraczała 120 nm. Nieco większą średnicą, bo wynoszącą 125 nm, charakteryzują się liposomy anionowe DPPC/DPPG. Natomiast liposomy puste z cholesterolem są o ponad 15 nm większe od pozostałych. Liposomy z chl *e* charakteryzują się podobnymi zależnościami. Największą średnicę posiadają liposomy z cholesterolem. Rozmiary liposomów z glikolem polietylenowym oraz DPPC/DPPG są

podobne do siebie i nie przekraczają 127 nm. Najmniejsze rozmiary pęcherzyków fosfolipidowych w porównaniu do dwóch wcześniej opisywanych grup zaobserwowano dla liposomów z chl *c*. Jednakże zależność pomiędzy rozmiarami poszczególnych typów liposomów jest podobna. Najmniejsze są liposomy z glikolem polietylenowym oraz DPPC/DPPG, ich średnica wynosi od 111 do 114.3 nm. Liposomy HSPC/Chol oraz HSPC/DOTAP/Chol są o co najmniej 12 nm większe od pozostałych. Natomiast liposomy anionowe DPPC/DPPG z chl *k* charakteryzują się średnicą 118.4 nm i są mniejsze od liposomów tego samego typu z chl *e* oraz pustych. Jednakże w porównaniu do liposomów DPPC/DPPG z chl *c* są większe.

Wartości współczynnika polidispersyjności uzyskane dla wszystkich badanych typów liposomów zarówno pustych, jak i ze związkiem są mniejsze od 0.14. Zgodnie z danymi literaturowymi, jeżeli wartość PDI nie przekracza 0.3 uzyskana zawiesina liposomów jest jednorodna [140, 141]. W związku z powyższym otrzymane mieszaniny liposomów charakteryzują się homogenicznym rozkładem wielkości pęcherzyków.

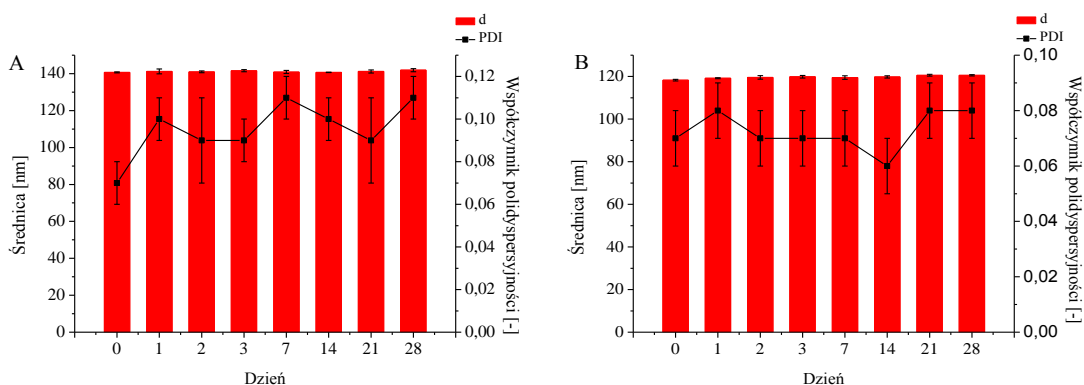
Rozmiar pęcherzyków fosfolipidowych jest jednym z kilku parametrów decydujących o efektywności terapeutycznej liposomowej formulacji leku. Określenie średnicy badanych liposomów oraz wpływu zamykanych w nich leków na ich rozmiar pozwala ocenić czy uzyskane kompleksy liposom-lek będą mogły być wykorzystane do dostarczania leków przeciwnowotworowych. Ze względu na morfologię guza nośniki liposomowe powinny charakteryzować się rozmiarami w zakresie od 100 do maksymalnie 400 nm. Średnice testowanych liposomów nie przekraczają 170 nm, a zatem ich rozmiar jest odpowiedni do transportu leków do guza nowotworowego przez układ nieszczelnych naczyń krwionośnych. Prowadzone są również liczne badania nad określeniem wpływu rozmiaru liposomów na ich akumulację w tkankach docelowych, czas krążenia w krwioobiegu oraz na efektywność terapeutyczną zamykanego w nich leku. Przykładowo Meerovich wraz ze współpracownikami opublikował pracę, w której opisał zależność między poziomem i selektywnością akumulacji w guzie fotouczulacza Tiosens a rozmiarem nośników liposomowych [142]. Do badań wykorzystali liposomową formulację tego związku. Fotouczulacz zamykany był w dwuwarstwie fosfolipidowej ze względu na jego hydrofobowy charakter. Liposomy zostały wykonane z lecytyny, cholesterolu oraz fosfatydyloetanolaminy z glikolem polietylenowym. Zaobserwowali, że akumulacja liposomów o średnicy 180 – 450 nm w guzie jest niewystarczająca do osiągnięcia odpowiedniego efektu terapeutycznego. Spowodowane jest to krótkim czasem krążenia tych liposomów w krwioobiegu, jak i niewystarczającym

wynacznieniem poprzez śródbłonek nowych naczyń krwionośnych zaopatrujących guz nowotworowy. W przypadku liposomów o średnicy 75 – 130 nm zauważyli wysoki poziom akumulacji liposomów w tkankach docelowych zarówno ze względu na relatywnie długi czas ich krążenia w krwioobiegu, jak i wystarczające wynacznienie guza. Zmniejszenie rozmiaru liposomów poniżej 50 – 60 nm spowodowało wysoki stopień ich akumulacji zarówno w tkankach nowotworowych jak i zdrowych. W związku z tym efektem obniżyła się selektywność gromadzenia leku w miejscu docelowych oraz przedłużył się czas jego usuwania ze zdrowych tkanek [142]. W pracy Awasthi wraz ze współautorami [143] prowadził badania w celu określenia rozmiaru liposomów z glikolem polietylenowym charakteryzujących się najdłuższym czasem krążenia w krwioobiegu. Testowali oni liposomy, których dwuwarstwa fosfolipidowa zbudowana była z cholesterolu, distearoilofosfatydylocholiny oraz distearoilofosfoetanolaminy z glikolem polietylenowym. Średnica badanych liposomów wynosiła odpowiednio 136.2; 165.5; 209.2; 275 oraz 318 nm. Ocena czasu krążenia oraz dystrybucji zaaplikowanych królikom liposomów była możliwa dzięki ich znakowaniu przez radionuklid – Technet-99m (Tc-99m). Z przeprowadzonych przez nich badań wynika, iż wszystkie liposomy wykazywały przedłużony czas krążenia we krwi, a ich ilość w krwioobiegu po 24 godzinach zależała od średnicy liposomów. Zaobserwowali wzrost radioaktywności w śledzionie wraz ze wzrostem średnicy aplikowanych liposomów. Jednakże najdłuższy czas krążenia w krwioobiegu uzyskali dla liposomów o średnicy w zakresie od 160 do 220 nm. Liposomy te charakteryzują się także minimalnym wychwytem przez wątrobę oraz umiarkowanym poborem przez śledzionę [143].

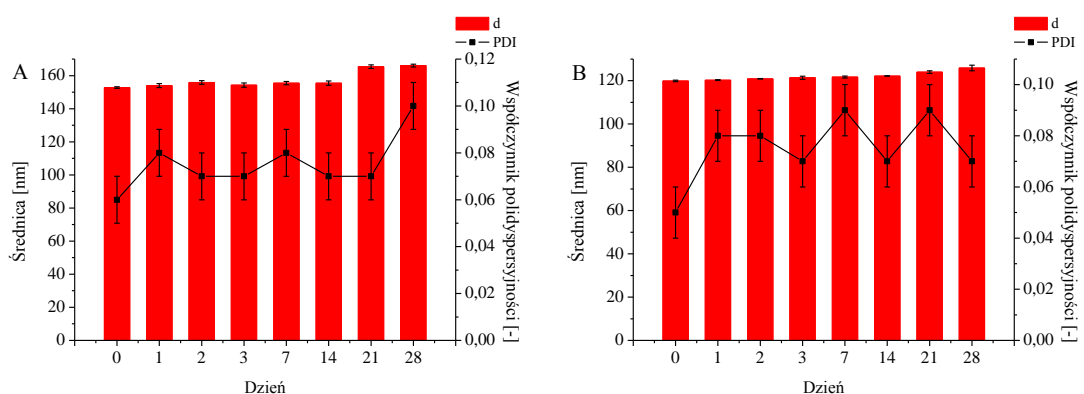
IV. 2. 2. Stabilność liposomów

Celem eksperymentu było określenie stabilności testowanych liposomów podczas ich przechowywania w zaciemnionym miejscu w temperaturze 3 °C oraz sprawdzenie, czy zamykane związki wpływają na zmianę ich średnicy oraz współczynnika polidispersyjności. Otrzymane wyniki przedstawiono na wykresach 24 – 33.

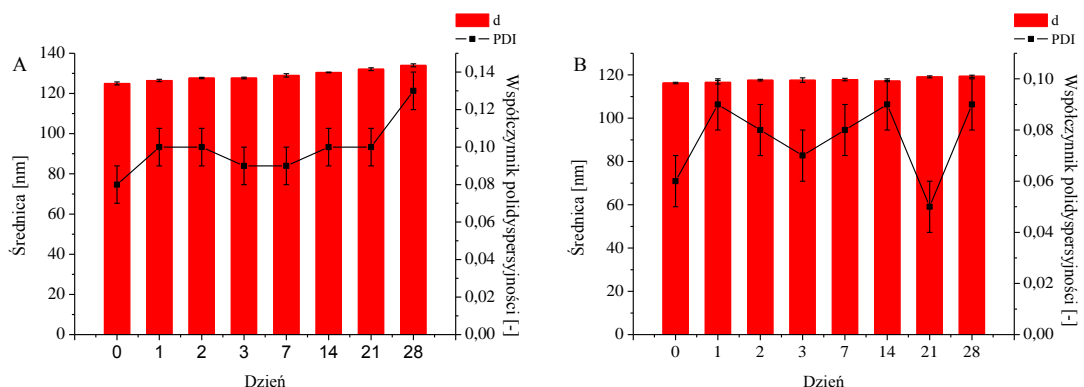
IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW



Wykres 24: Badanie stabilności pustych liposomów neutralnych A) HSPC/Chol; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.

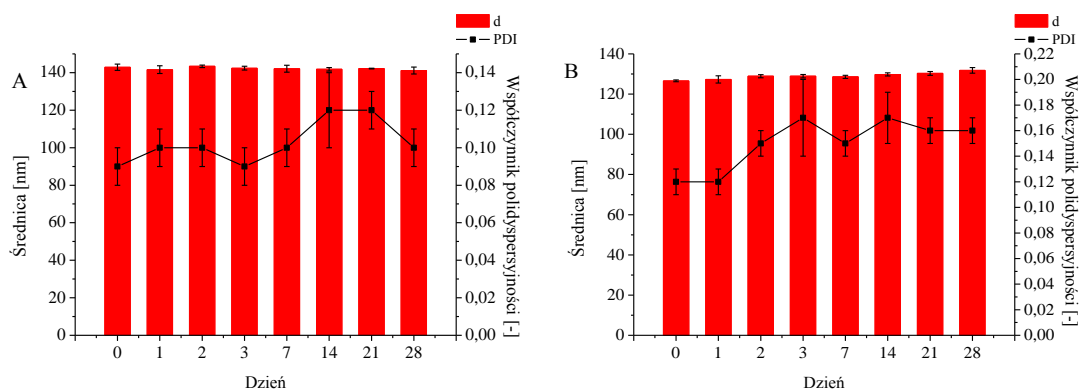


Wykres 25: Badanie stabilności pustych liposomów kationowych A) HSPC/DOTAP/Chol; B) HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.

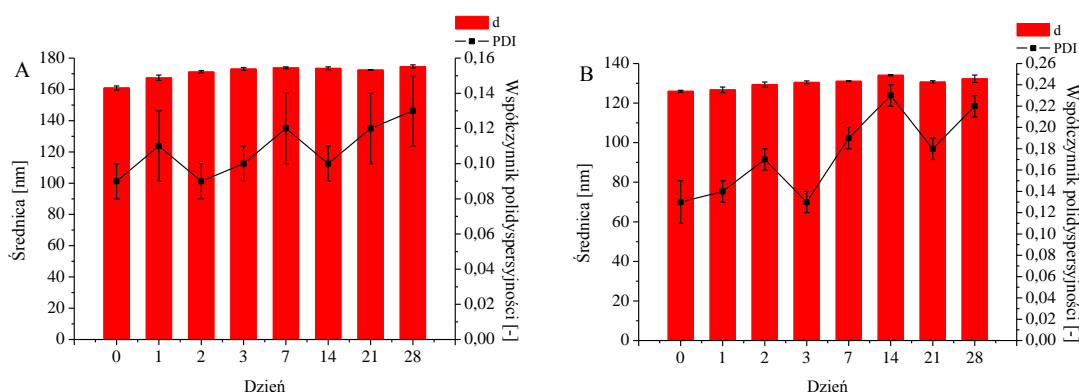


Wykres 26: Badanie stabilności pustych liposomów anionowych A) DPPC/DPPG; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.

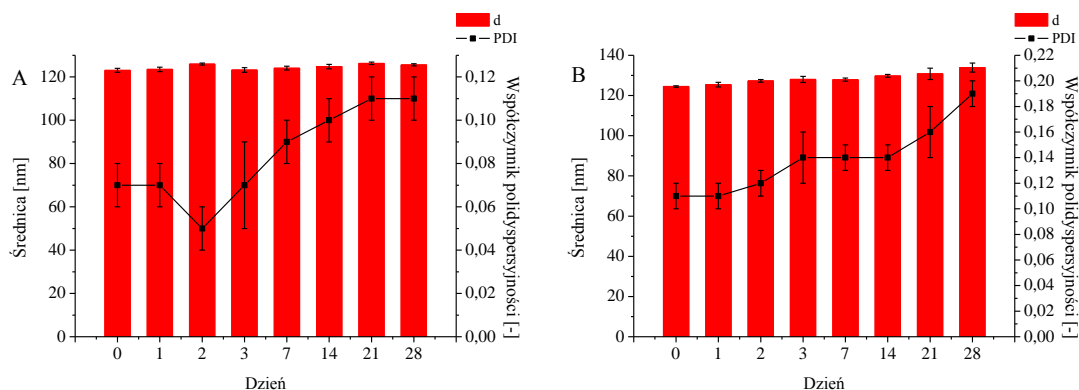
IV. ANALIZA I Dyskusja Wyników



Wykres 27: Badanie stabilności neutralnych liposomów z chl *e* A) HSPC/Chol; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.

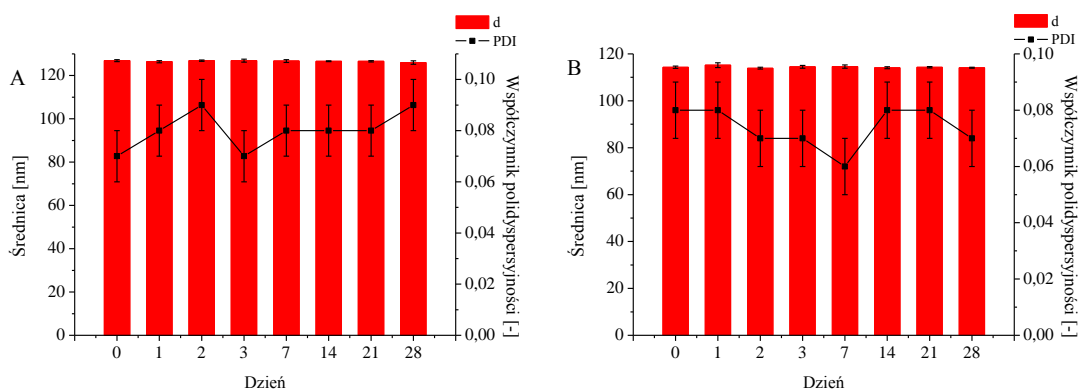


Wykres 28: Badanie stabilności kationowych liposomów z chl *e* A) HSPC/DOTAP/Chol; B) HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.

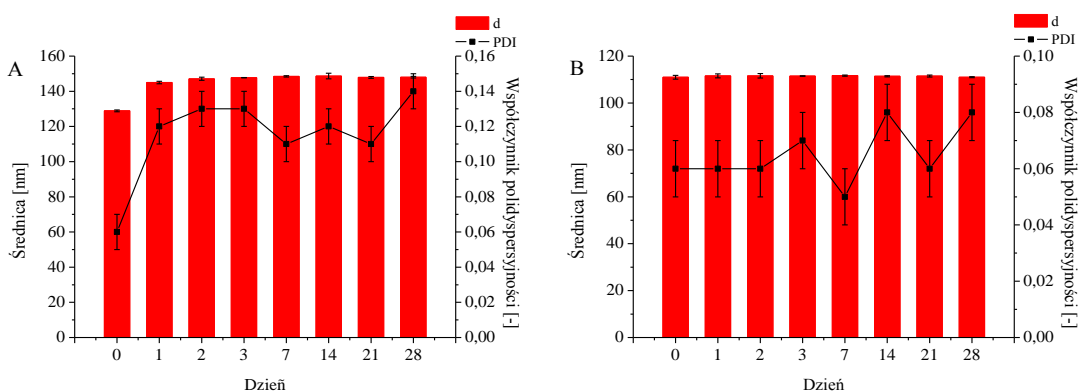


Wykres 29: Badanie stabilności anionowych liposomów z chl *e* A) DPPC/DPPG; B) HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.

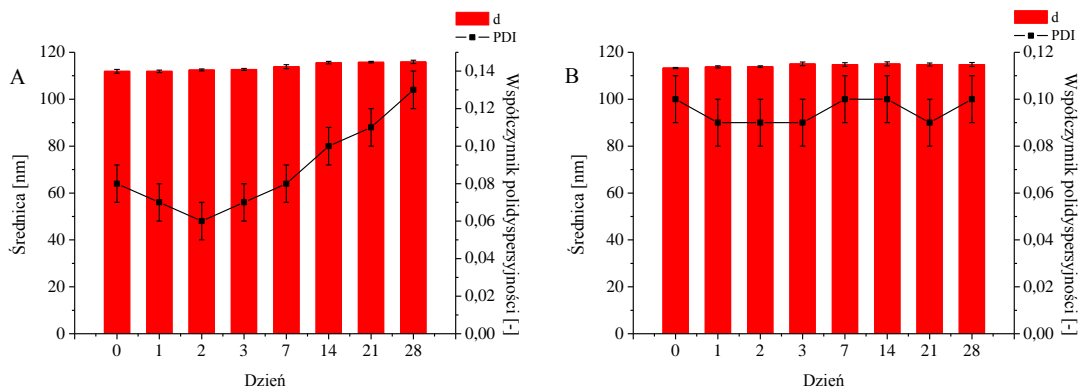
IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW



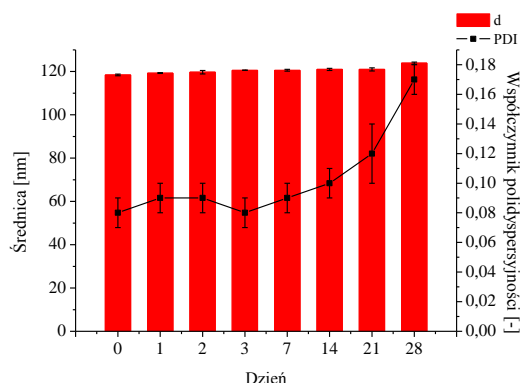
Wykres 30: Badanie stabilności neutralnych liposomów z chl c A) HSPC/Chol; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.



Wykres 31: Badanie stabilności kationowych liposomów z chl c A) HSPC/DOTAP/Chol; B) HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.



Wykres 32: Badanie stabilności anionowych liposomów z chl c A) DPPC/DPPG; B) HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.



Wykres 33: Badanie stabilności liposomów anionowych DPPC/DPPG z chl *k* podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.

Puste liposomy HSPC/Chol oraz HSPC/DSPE-PEG 2000 są stabilne podczas przechowywania w temperaturze 3 °C (Wykres 24). W przypadku pustych liposomów kationowych (Wykres 25) można zaobserwować wzrost średnicy po 14 dniu przechowywania. Dla liposomów z cholesterolem wartość średnicy wzrasta o 10 nm, a z glikolem polietylenowym maksymalnie o 7 nm. Natomiast dla pustych liposomów anionowych (Wykres 26) występują niewielkie zmiany średnicy wynoszące 2 – 3 nm, które podobnie jak w przypadku liposomów kationowych pojawiają się dopiero po 14 dniu przechowywania.

W przypadku liposomów neutralnych z chl *e* (Wykres 27) pojawiają się niewielkie zmiany w ich średnicy, wynoszące od 2 do 5 nm. Natomiast dla liposomów kationowych (Wykres 28) zaobserwowano pogorszenie się ich stabilności, w porównaniu z liposomami pustymi tego samego typu. Średnica liposomów HSPC/DOTAP/Chol zwiększa się o 7 nm po 24 godzinach od momentu ich przygotowania, po czym w kolejnych dniach stopniowo wzrasta uzyskując wartość 174.9 nm w 28 dniu. Jest ona o około 14 nm większa od średnicy uzyskanej w dniu przygotowania zawiesiny liposomowej. W przypadku liposomów HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 z chl *e* maksymalna zmiana średnicy wynosi 8 nm (dzień 14). Liposomy DPPC/DPPG (Wykres 29 A) charakteryzują się małymi zmianami w rozmiarach średnicy. Maksymalnie wzrasta ona o 3 nm (dzień 2). Natomiast liposomy HSPC/DSPG/DSPE-PEG (Wykres 29 B) charakteryzują się stopniowym wzrostem rozmiaru średnicy, która w rezultacie końcowym wynosi prawie 134 nm i jest o około 10 nm większa od średnicy otrzymanej w dniu przygotowaniu próbki.

Dla liposomów neutralnych (Wykres 30) oraz liposomów HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (Wykres 31 B) z chl *c* zaobserwowano niewielkie

zmiany średnicy. W przypadku liposomów kationowych z cholesterolem (Wykres 31 A) widać wzrost średnicy o około 17 nm po upływie 24 godzin od momentu ich przygotowania. W kolejnych dniach wartości średnic są zbliżone do siebie. Stabilność liposomów anionowych z chl *c* (Wykres 32) jest natomiast porównywana do liposomów pustych tego samego typu.

Średnica liposomów DPPC/DPPG z chl *k* (Wykres 33) zmienia się niewiele w poszczególnych dniach pomiarowych, za wyjątkiem ostatniego dnia, gdzie wzrasta ona prawie o 4 nm w porównaniu do średnicy uzyskanej bezpośrednio po przygotowaniu zawiesiny.

Porównując wartości współczynnika polidispersyjności uzyskane dla poszczególnych typów liposomów zaobserwowano małe fluktuacje dla liposomów neutralnych zarówno pustych, jak i z chl *e* oraz *c*. Ze względu na to, że wartość początkowa PDI dla tych liposomów nie różni się znacząco od wartości uzyskanej po 28 dniach przechowywania można uznać, iż zawiesiny liposomowe są w dalszym ciągu jednorodne. Podobne fluktuacje wartości współczynnika PDI występują dla pustych liposomów kationowych oraz dla liposomów HSPC/DOTAP/Chol z chl *e* i HSPC/DOTAP/DSPE-PEG z chl *c*. W przypadku liposomów anionowych za wyjątkiem HSPC/DSPG/DSPE-PEG z chl *c* obserwuje się znaczny wzrost wartości współczynnika polidispersyjności.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wynika, iż najbardziej stabilne są liposomy HSPC/Chol oraz HSPC/DSPE-PEG 2000 zarówno puste, jak i z chl *e* oraz *c*. Pozostałe typy liposomów są stabilne przy krótszym czasie przechowywania, jak na przykład puste liposomy kationowe czy liposomy DPPC/DPPG z chl *k*, które są stabilne do 14 dni od momentu ich przygotowania. Liposomy kationowe oraz anionowe z chl *e* oraz *c* powinny być przygotowywane bezpośrednio przed użyciem, gdyż wykazują one najmniejszą stabilność podczas przechowywania w temperaturze 3 °C.

IV. 2. 3. Efektywność zamykania

W kolejnym etapie badań określono efektywność zamykania fotouczulaczy w testowanych nośnikach liposomowych. Procedura wyznaczania tego parametru została opisana w rozdziale III. 5. 2. 3., natomiast szczegółowy opis tworzenia krzywych kalibracyjnych przedstawiony jest w załącznikach 2 i 3. W tabeli 15 zamieszczano

średnie wartości efektywności zamykania wraz z odchyleniem standardowym otrzymane dla badanych liposomów. Ze względu na małe ilości chl *k* do badań parametr ten wyznaczono tylko dla chl *e* i *c*.

Tabela 15: Efektywność zamykania (*EE*) chloryn *e* i *c* w nośnikach liposomowych.

Typ liposomu	EE [%] Chl <i>e</i>	EE [%] Chl <i>c</i>
HSPC/Chol (7:3)	89.83 ± 5.10	96.68 ± 2.07
HSPC/DSPE-PEG 2000 (9.5:0.5)	82.03 ± 2.38	91.84 ± 0.87
HSPC/DOTAP/Chol (6:1:3)	89.19 ± 4.00	97.77 ± 5.80
HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5)	91.20 ± 3.19	87.69 ± 7.27
DPPC/DPPG (9:1)	95.66 ± 5.54	90.17 ± 2.05
HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5)	92.90 ± 1.67	92.95 ± 4.17

Efektywność zamykania chl *e* oraz chl *c* w różnych typach liposomów jest wysoka i wynosi ponad 80%. W przypadku chl *e* największą efektywność uzyskano dla liposomów anionowych DPPC/DPPG ponad 95%. Dla liposomów stabilizowanych sferycznie (HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 oraz HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000) wartość ta nieco maleje do 91 – 92%. W przypadku liposomów z cholesterolem efektywność zamykania chl *e* jest nieco poniżej 90%, natomiast dla liposomów HSPC/DSPE-PEG 2000 jest najniższa z pośród uzyskanych wartości i wynosi około 82%.

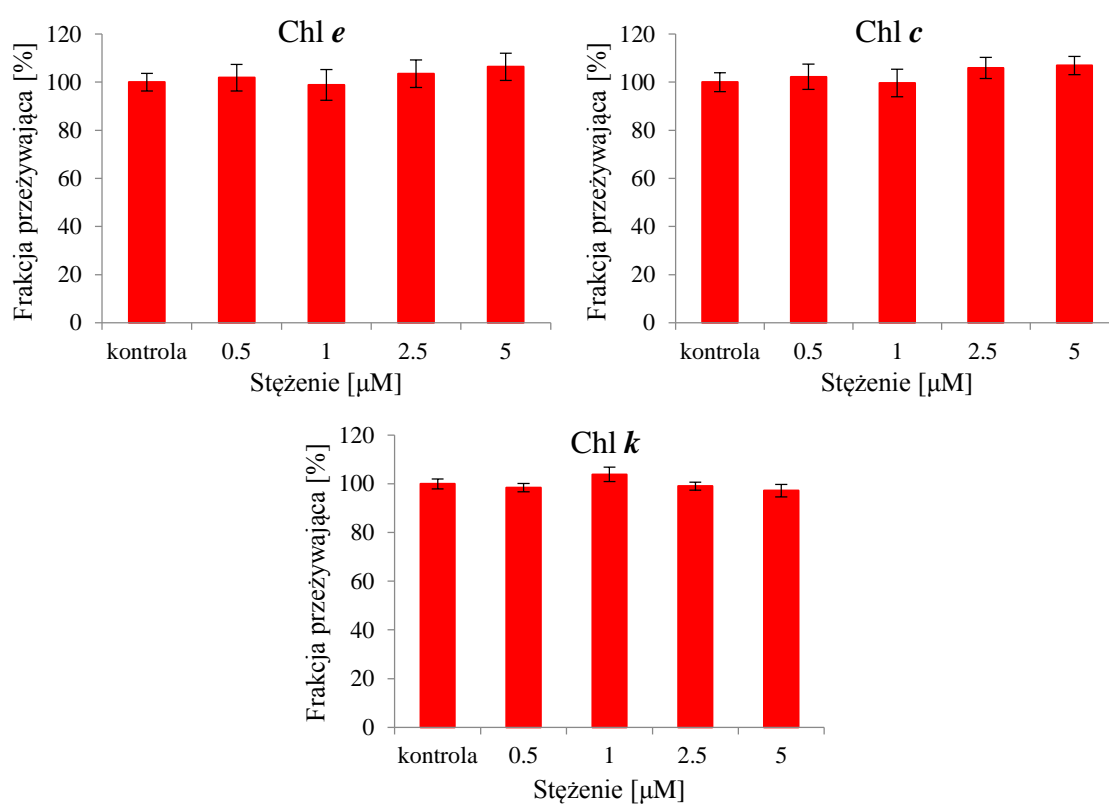
Inaczej wygląda kolejność rozkładu efektywności zamykania dla chl *c* od wartości największej do najmniejszej. Mianowicie najwyższą efektywnością, która wynosi ponad 96% charakteryzują się liposomy z cholesterolem. Liposomy anionowe oraz HSPC/DSPE-PEG 2000 posiadają efektywność zamykania chl *c* w zakresie 90 – 93%. Natomiast najniższą efektywność zaobserwowano dla liposomów HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (około 88%).

IV. 2. 4. Test MTS

W ostatnim etapie badań wykonano eksperymenty biologiczne *in vitro* na komórkach raka jelita grubego HCT116. Pozwoliły one ocenić efektywność terapeutyczną badanych kompleksów liposom-lek. Dodatkowo porównując wyniki otrzymane dla testowanych kompleksów z wynikami uzyskanymi dla samych fotouczulaczy, niezamkniętych w nośnikach liposomowych, oceniono, czy

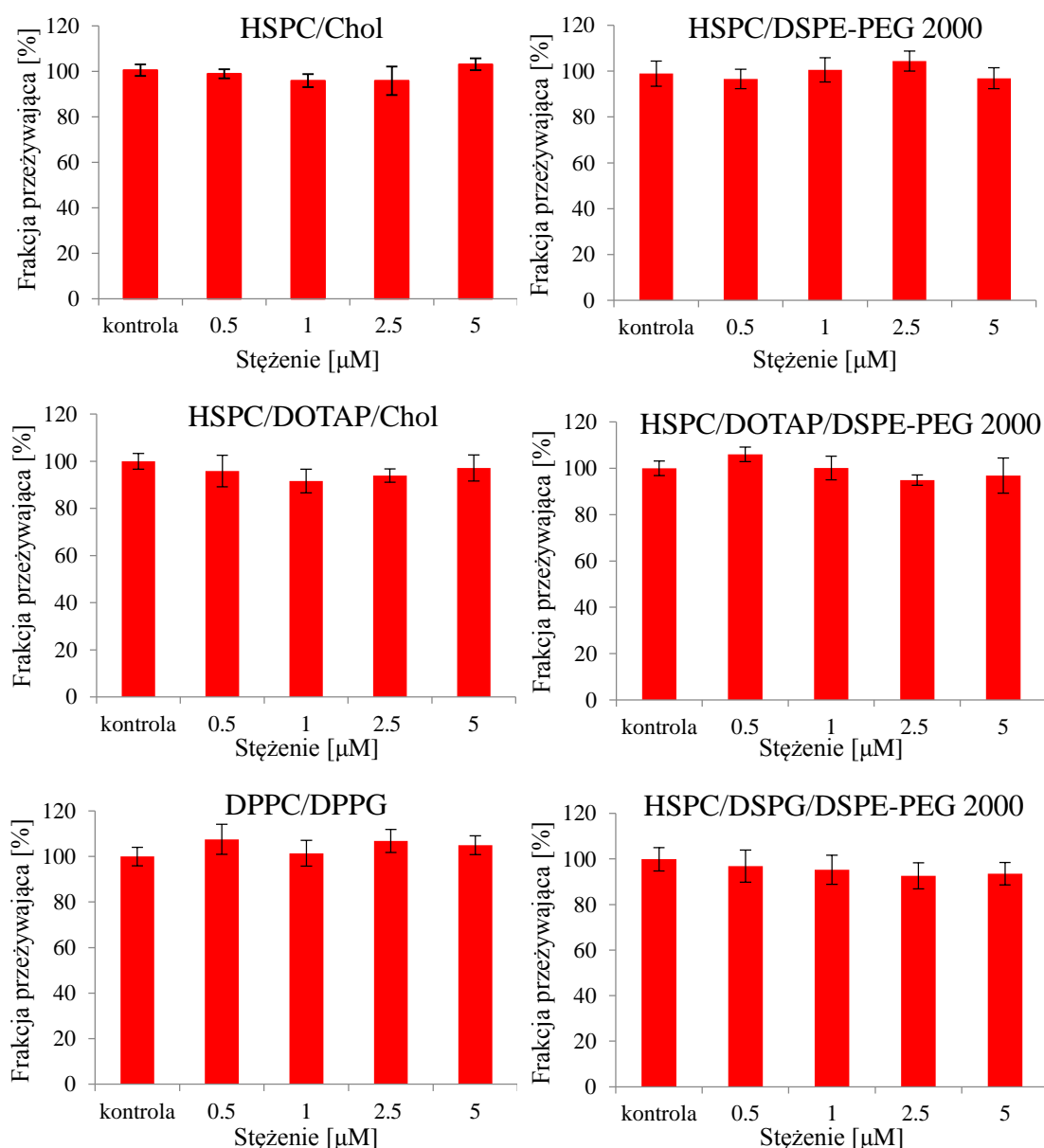
IV. ANALIZA I DISKUSJA WYNIKÓW

zaprojektowane nośniki wpływają na wzrost skuteczności terapii fotodynamicznej. W pierwszej kolejności przeprowadzono badania toksyczności ciemnej pozwalające sprawdzić, czy badane liposomy, fotouczulacze oraz kompleksy liposom-lek wpływają na proliferację komórek. Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej ważne jest, aby zarówno badane fotouczulacze, jak i liposomy nie wykazywały toksyczności ciemnej, czyli przy braku światła nie powinny wpływać na proliferację komórek. Na wykresie 34 przedstawiono toksyczność ciemną otrzymaną dla testowanych fotouczulaczy. Nie zaobserwowano wpływu chloryn na proliferację komórek. Niezależnie od stężenia aplikowanego związku frakcje komórek przeżywających są bliskie 100%.



Wykres 34: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla badanych fotouczulaczy po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).

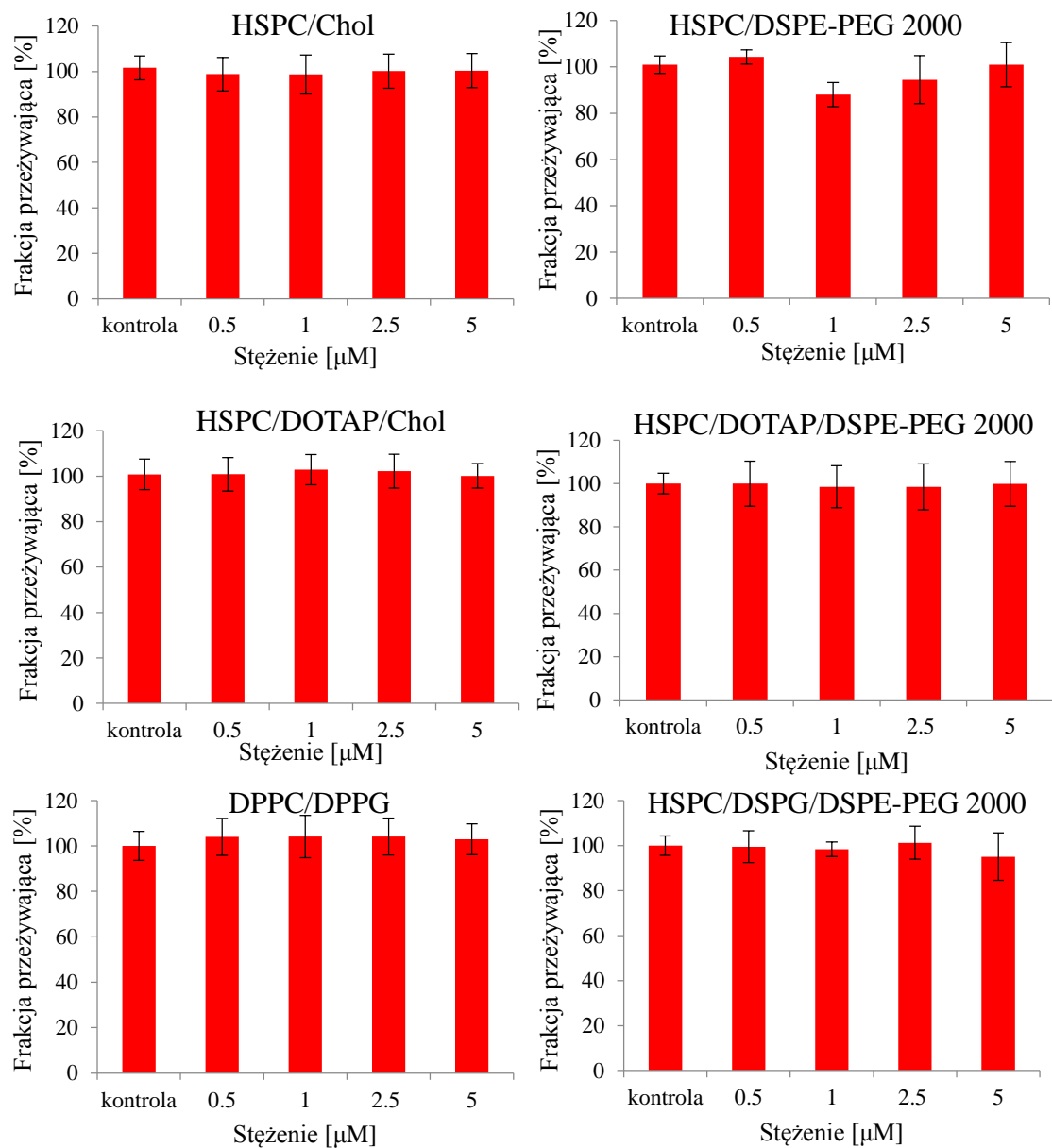
Wyniki toksyczności ciemnej uzyskane dla pustych liposomów przedstawiono na wykresie 35. Przeżywalność komórek po 4 godzinnej inkubacji z pustymi liposomami jest wysoka. Największe różnice przy porównywaniu badanej grupy z grupą kontrolną, dla której proliferacja komórek wynosiła 100%, zaobserwowano dla liposomów kationowych HSPC/DOTAP/Chol przy stężeniu 1 μM (frakcja przeżywająca wynosiła około 92%).



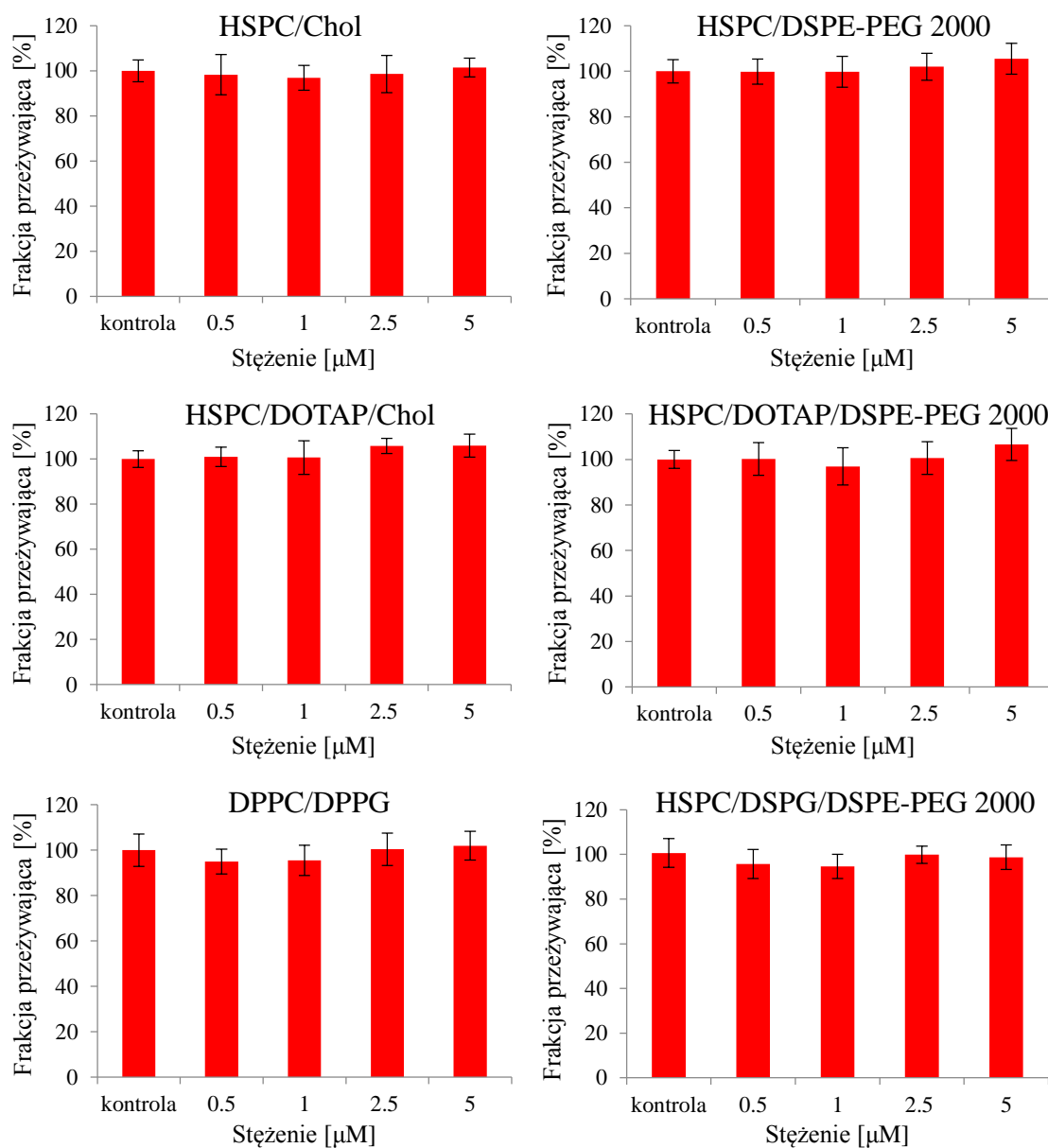
Wykres 35: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla pustych liposomów po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).

Na wykresach 36 – 38 przedstawiono toksyczność ciemną uzyskaną dla testowanych kompleksów liposom-lek. Podobnie, jak w przypadku chl *e*, chl *c*, chl *k* oraz pustych liposomów przeżywalność komórek po 4 godzinnej inkubacji z kompleksem wynosiła ponad 95%. Niewielką toksyczność zaobserwowano dla liposomów

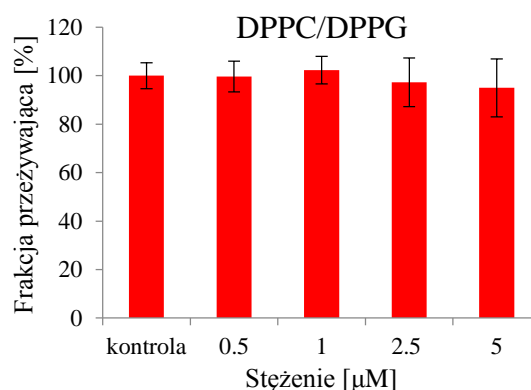
HSPC/DSPE-PEG 2000 z chl *e*, frakcja komórek przeżywających spada do około 88% przy stężeniu 1 μM .



Wykres 36: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla liposomów z chl *e* po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).



Wykres 37: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla liposomów z chl c po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).

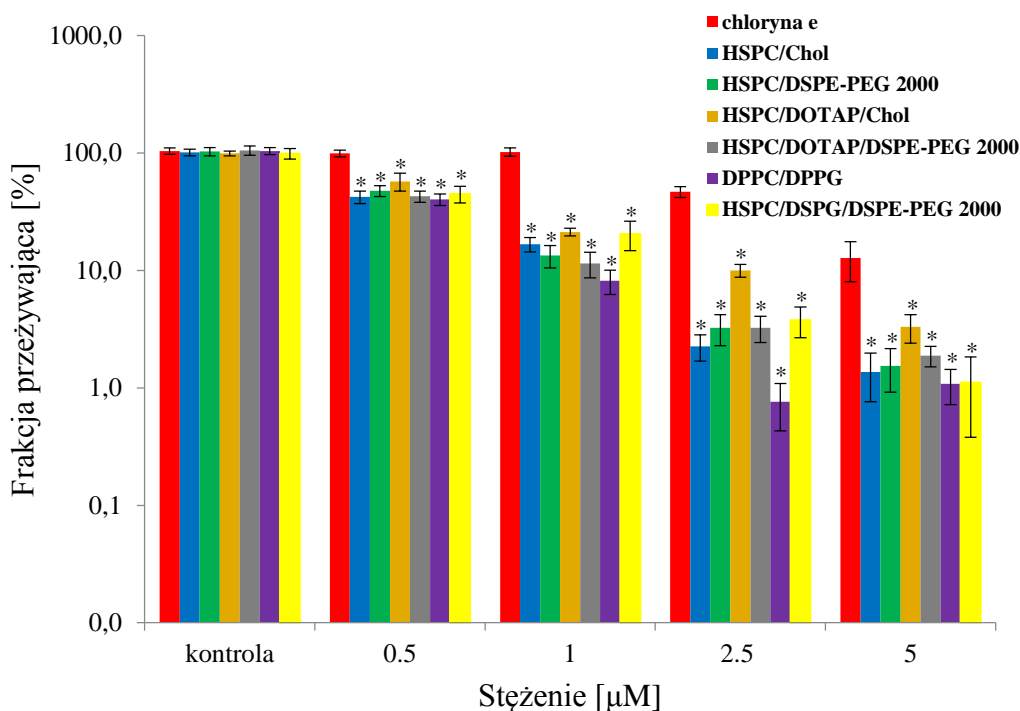


Wykres 38: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla liposomów z chl *k* po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).

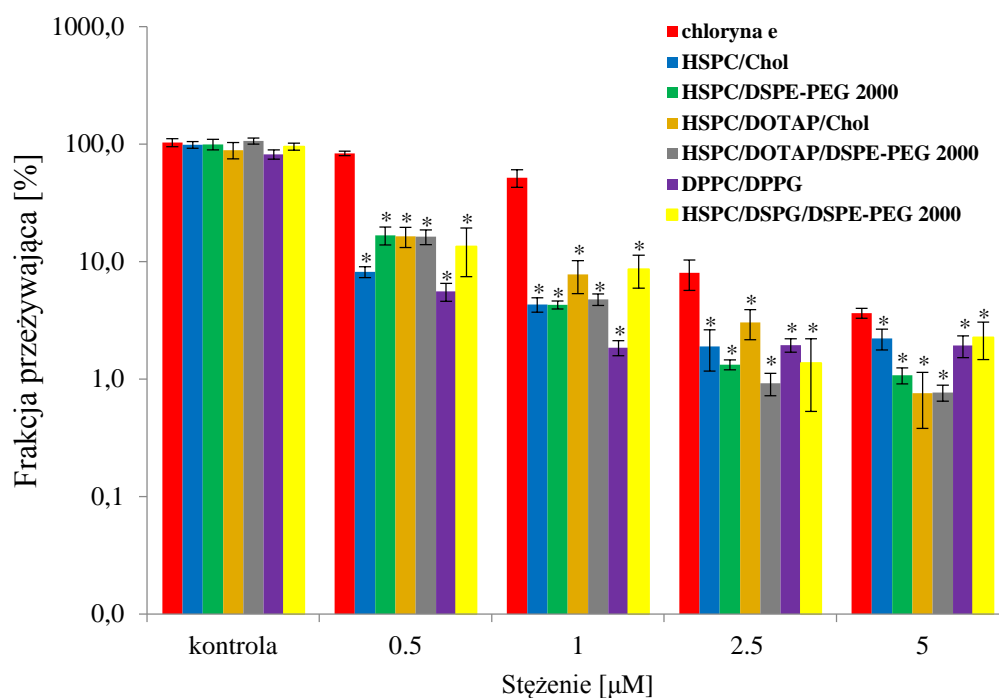
Otrzymane wyniki z toksyczności ciemnej potwierdzają, że badane fotouczulacze, liposomy oraz kompleksy liposom-lek przy braku światła są nietoksyczne. Zaobserwowano jedynie niewielkie, kilku procentowe spadki przeżywalności komórek. Efekt ten widoczny jest zarówno dla niskich, jak i wysokich stężeń testowanych fotouczulaczy w postaci wolnej oraz zamkniętej w liposomach. Największy spadek przeżywalności komórek o około 12% zaobserwowano dla liposomów HSPC/DSPE-PEG 2000 z chl *e*.

W drugim etapie badań biologicznych przeprowadzono eksperymenty pozwalające ocenić efekt fotodynamiczny testowanych kompleksów liposom-lek w porównaniu do efektu uzyskanego dla samego fotouczulacza. Na wykresach 39 i 40 przedstawiono przeżywalność komórek po 4 godzinnej inkubacji z chl *e* oraz z jej liposomowymi formułacjami. Czasy naświetlań komórek wynosiły 1 i 3 minuty, co odpowiadało dawkom 4.2 i 12.5 J/cm². Zaobserwowano, że przy każdym badanym stężeniu aplikowanego związku większy efekty fotodynamiczny uzyskano dla testowanych formułacji liposomowych (Wykres 39). Przykładowo dla najniższego badanego stężenia przeżywalność komórek jest od 1.7 (HSPC/DOTAP/Chol) do 2.5 (DPPC/DPPG) razy mniejsza w porównaniu do samego związku. Liposomy z chl *e* powodowały nawet 61-krotnie większą śmiertelność komórek niż sam związek (liposomy DPPC/DPPG przy stężeniu 2.5 μM – Wykres 39). Dla dawki światła 12.5 J/cm² formułacje liposomowe z chl *e* również charakteryzują się większym niż uzyskanym dla samego fotouczulacza efektem fotodynamicznym (Wykres 40). Największe różnice w przeżywalności komórek zaobserwowano dla liposomów DPPC/DPPG przy stężeniu związku 0.5 i 1 μM, w porównaniu do samej chl *e*. Dla tych liposomów przeżywalność

komórek była odpowiednio 15- i 28-krotnie mniejsza od frakcji przeżywającej po aplikacji fotouczulacza w postaci wolnej.



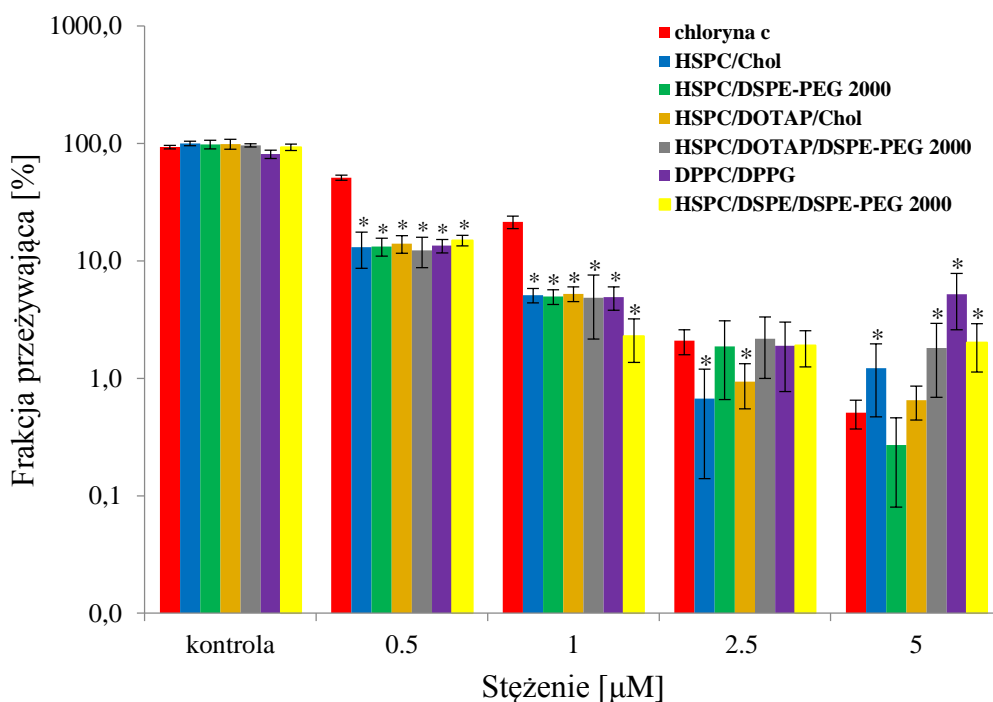
Wykres 39: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl *e* oraz jej liposomowych formułacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 4.2 J/cm² (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.



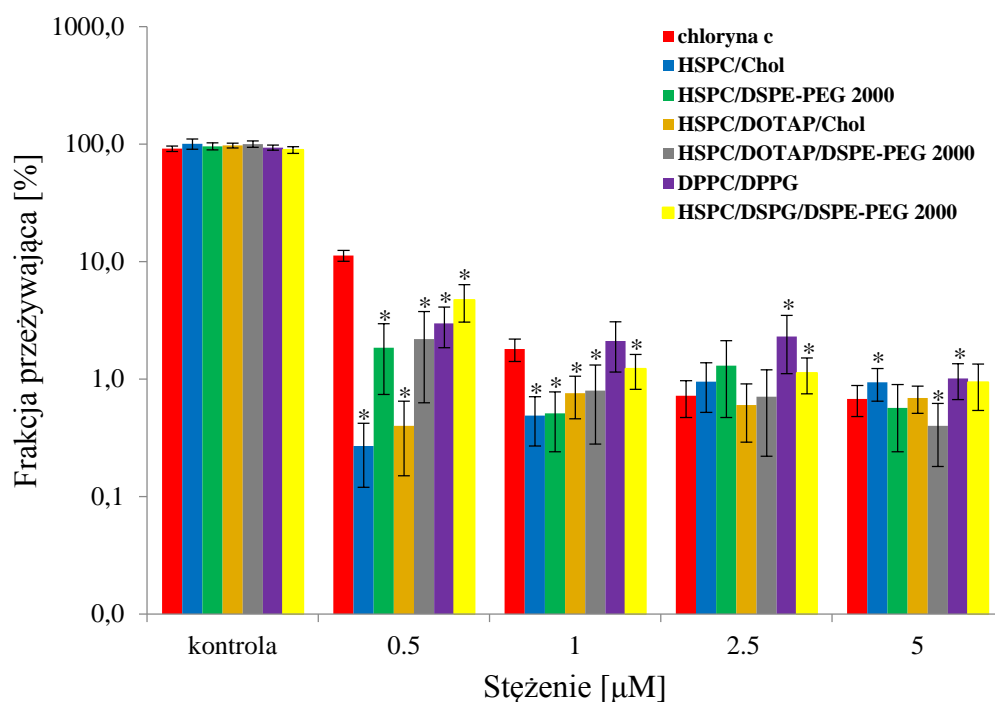
Wykres 40: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl *e* oraz jej liposomowych formułacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 12.5 J/cm² (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.

Analogiczny eksperyment przeprowadzono dla chl *c*. Na wykresach 41 i 42 przedstawiono przeżywalność komórek nowotworowych po 4 godzinnej inkubacji z fotouczulaczem oraz jego liposomowymi formułacjami dla dwóch różnych czasów naświetlań. Przy niższych stężeniach badanego fotouczulacza (0.5 oraz 1 μM) i dawce światła 4.2 J/cm² liposomy z chl *c* charakteryzują się większym niż uzyskanym dla samego związku efektem fotodynamicznym (Wykres 41). Przeżywalność komórek przy 0.5 μM stężeniu fotouczulacza zamkniętego w liposomach HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 jest 4.2 razy mniejsza, a w przypadku stężenia 1 μM prawie 10 razy mniejsza od liczby komórek, które przeżyły naświetlanie po inkubacji z samym związkiem. Dla wyższych stężeń związku różnice pomiędzy przeżywalnością komórek uzyskaną dla chl *c*, a poszczególnymi typami liposomów nie są już tak wyraźne. Najlepszy efekt fotodynamiczny uzyskano dla liposomów HSPC/Chol z chl *c* o stężeniu 0.5 μM i przy dawce światła 12.5 J/cm². W tym przypadku przeżywalność komórek jest 42 razy mniejsza od przeżywalności komórek uzyskanych dla samej chl *c* przy tym samym stężeniu (Wykres 42). Przy wyższych stężeniach badanego związku różnice pomiędzy efektem fotodynamicznym otrzymanym dla chl *c*, a poszczególnymi

formulacjami liposomowymi nie są, aż tak wyraźne. W odróżnieniu od wyników otrzymanych dla chl *e* i jej formulacji liposomowych, gdzie wraz ze wzrostem dawki światła wzrastał efekt fotodynamiczny, chl *c* charakteryzuje się zanikiem tej tendencji przy wyższych stężeniach oraz przy czasie naświetlania 3 minut.

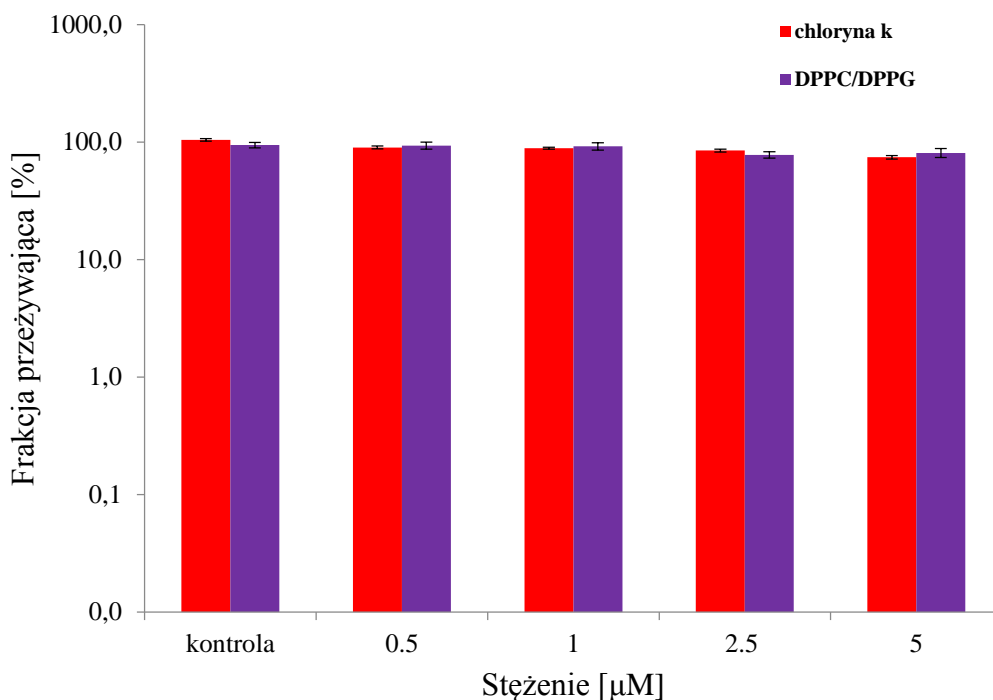


Wykres 41: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl *c* oraz jej liposomowych formulacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 4.2 J/cm² (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.



Wykres 42: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl *c* oraz jej liposomowych formułacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 12.5 J/cm^2 (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.

Na wykresie 43 przedstawiono przeżywalność komórek po 4 godzinnej inkubacji z chl *k* oraz jej liposomową formułacją DPPC/DPPG po 3 minutowym naświetleniu, co odpowiadało dawce światła 12.5 J/cm^2 . Z zaprezentowanych danych widać, iż wraz ze wzrostem stężenia chloryny maleje frakcja przeżywająca komórek. Jednakże przy najwyższym badanym stężeniu ($5 \mu\text{M}$), wynosi ona ponad 70%. Zamknięcie chl *k* w liposomach w celu poprawy jej efektywności fotodynamicznej niestety nie zwiększyło jej skuteczności. Przeżywalność komórek dla kompleksu liposom-chloryna *k* jest nadal wysoka i przy $5 \mu\text{M}$ stężeniu fotouczulacza wynosi około 81%.



Wykres 43: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl *k* oraz jej liposomowych formułacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 12.5 J/cm² (fototoksyczność).

Dostarczanie fotouczulaczy selektywnie do komórek nowotworowych stanowi jeden z głównych wyzwań w terapii fotodynamicznej. Wykorzystanie nanotechnologii w postaci nośników liposomowych stwarza duże możliwości do osiągnięcia tego celu. Na podstawie przeprowadzonych badań w przypadku chl *e* oraz chl *c* można zaobserwować wzrost efektu fotodynamicznego dla formułacji liposomów tych związków. Zastosowanie zatem pęcherzyków liposomowych zwiększyło efektywność terapii.

Liposomy są wykorzystywane nie tylko, jako nośniki potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Obecnie istnieje wiele artykułów na temat ich zastosowania z komercyjnie dostępnymi lekami w celu poprawy efektywności terapii fotodynamicznej. Przykładowo Kiesslich wraz ze współpracownikami przedstawili wyniki badań dla komercyjnego związku – Foscan oraz dla jego formułacji liposomowej Foslip (DPPC/DPPG 9:1) [144]. Eksperymenty przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych: GBC (linia komórek ludzkiego raka pęcherzyka żółciowego z ang. gall bladder cancer) oraz BDC (linia komórek ludzkiego raka dróg żółciowych z ang. bile duct cancer). Z przeprowadzonych badań wynika, iż liposomowa formułacja leku – Foslip jest mniej toksyczna w ciemności niż sam związek, natomiast efekt fotodynamiczny jest

większy przy aplikacji samego związku. Jednakże po dodaniu do medium surowicy FBS różnice pomiędzy lekiem, a jego liposomową formulacją stają się nieistotne statystycznie. Otrzymane zatem przez Kiesslich wyniki są obiecujące i skłaniają do przeprowadzenia badań *in vivo* w celu weryfikacji otrzymanych zależności. Parę lat później Compagnin wraz ze współpracownikami scharakteryzował liposomowe formulacje Foscanu – Fospeg (DPPC:DPPG 18:2 z mPEG-DSPE) [145]. W odróżnieniu od poprzednika były to liposomy stabilizowane sferycznie, zawierające w swoim składzie lipidowym od 2 do 8 mol% mPEG-DSPE o różnej długości łańcucha polimerowego. Badania toksyczności ciemnej przeprowadzone na linii komórkowej ludzkiego raka płuc A549 oraz na fibroblastach normalnych ludzkich komórek płuc CCD-34Lu również wykazały, iż lek we wszystkich badanych stężeniach (1 – 5 μM) zamknięty w liposomach jest mniej toksyczny w odróżnieniu od samego związku, który wykazuje toksyczność powyżej 1 μM stężenia. Zaobserwowano również zanik toksyczności ciemnej dla liposomów zawierających w swoim składzie 8 mol% PEG-u. Badania fototoksyczności przeprowadzone na linii A549 wykazały, iż przeżywalność komórek nowotworowych po aplikacji leku zamkniętego w liposomach jest nieco większa niż dla samego związku. Podobnie jak Kiesslich, autorzy tej pracy w przyszłości będą przeprowadzać testy na zwierzętach w celu określenia *in vivo* właściwości farmakokinetycznych, skuteczności PDT oraz efektów ubocznych formulacji Fospeg w stosunku do samego Foscanu. W obu przedstawionych powyżej przykładach mniejszy efekt fotodynamiczny dla badanych formulacji liposomowych mógł być spowodowanych ich niższym wychwytem przez komórki nowotworowe. W związku z tym Moret, który uczestniczył w badaniach z Fospeg [145] rozszerzył eksperymenty o liposomy zawierające kwas foliowy [146]. Celem jego przyłączenia było zwiększenie wychwytu liposomów przez komórki rakowe, odkąd odkryto, że często wykazują one nadmierną ekspresję receptorów kwasu foliowego. Receptory te są obecne w około 40% ludzkich nowotworów i nie występują w większości normalnych tkanek [146]. Badania przeprowadzono na linii komórkowej A549 niewykazującej ekspresji receptorów kwasu foliowego oraz na komórkach KB (pochodne HeLa) posiadające wysoki poziom ekspresji receptorów. Na podstawie wykonanych eksperymentów Moret wraz ze współpracownikami zaobserwował, iż dla komórek KB efekt fotodynamiczny jest 1.5 razy większy dla liposomów Fospeg z kwasem foliowym niż dla liposomów niecelowanych. W przypadku linii komórkowej A549 efekt fotodynamiczny był podobny dla obu formulacji liposomowych. Jednakże porównując wyniki fototoksyczności otrzymane dla obu linii zaobserwowano, że

IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

przeżywalność komórek przy stężeniu Foscanu 2 μM spada do 50% dla komórek A549 podczas, gdy dla KB przy tym samym stężeniu leku wynosi około 10 %. Testowane formułacje liposomowe nie wykazywały toksyczności ciemnej na obu badanych liniach komórkowych [146].

V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono badania, których celem była poprawa efektywności terapii fotodynamicznej poprzez dostarczenie testowanych chloryn do wnętrza komórki przy wykorzystaniu nośników liposomowych. Ze względu na rodzaj wykonywanych eksperymentów część badawczą można podzielić na dwa etapy. Pierwszy z nich związany był z charakterystyką fizykochemiczną fotouczulaczy z rodziny chloryn pod kątem ich wykorzystania w terapii PDT. Natomiast w drugim etapie badań, określono podstawowe parametry nośników liposomowych, zarówno z lekiem zamkniętym w dwuwarstwie fosfolipidowej, jak i bez. Podsumowaniem całej pracy było wykonanie badań biologicznych pozwalających ocenić, czy proponowane rozwiązanie, czyli zamykanie testowanych chloryn w nośnikach liposomowych, pozwala zwiększyć skuteczność terapii fotodynamicznej.

Charakterystykę fizykochemiczną przeprowadzono tylko dla jednego fotouczulacza, mianowicie dla chloryny *k*, gdyż pozostałe związki zostały już wcześniej scharakteryzowane [97]. Badania rozpoczęto od określenia podstawowych parametrów związku rozpuszczonego w różnych środowiskach za pomocą spektroskopii absorpcyjnej oraz emisyjnej. Wyznaczono położenia poszczególnych pasm absorpcji oraz wartości ich molowych współczynników absorpcji. Za pomocą krzywych zależności absorbancji od stężenia testowanego związku określono, czy ulega on agregacji podczas wykonywania dalszych rozcieńczeń. Dodatkowo przeprowadzono badania z surfaktantem – Triton X-100, w celu sprawdzenia, czy chloryna *k* ulega agregacji w środowisku wodnym na przykładzie buforu fosforanowego (PBS). Określono również położenia pasm emisji, wyznaczono wartość energii stanu singletowego oraz przesunięcie Stokesa. Czystość chemiczną związku oceniono na podstawie otrzymanych widm ekscytacyjnych i absorpcyjnych. W następnej kolejności wyznaczono wartości kwantowej wydajności fluorescencji dla różnych roztworów badanego związku oraz czas życia fluorescencji dla chloryny *k* rozpuszczonej w glicerynie. Za pomocą laserowej fotolizy błyskowej przeprowadzono pomiar czasu życia wzbudzonych molekuł fotouczulacza w stanie trypletowym oraz kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego. W ostatnim etapie fizykochemicznej charakterystyki potencjalnego leku przeciwnowotworowego przeprowadzono badania pozwalające określić stabilność testowanego fotouczulacza podczas przechowywania w miejscu o ograniczonym dostępie światła. Przy użyciu natomiast światła czerwonego wykonano eksperyment, dzięki któremu można sprawdzić,

czy związek ulega fotodegradacji oraz, czy podczas jego naświetlania nie powstają fotoprodukty.

Na podstawie wyników otrzymanych z powyższych badań można sformułować następujące wnioski:

- Ostatnie pasmo absorpcji położone jest w okolicy 640 nm, czyli spełnia założenie idealnego fotouczulacza związane z lokalizacją pasma w zakresie 600 – 850 nm. Jak wspomniano wcześniej długość fali z tego zakresu zapewnia odpowiednią penetrację światła w głąb tkanki oraz energia stanu trypletowego jest wystarczająca do produkcji tlenu singletowego.
- Wartość molowego współczynnika absorpcji dla ostatniego pasma Q jest najwyższa spośród wszystkich pasm Q. Dodatkowo wartość ta jest wyższa w porównaniu do niektórych komercyjnych związków (Photofrin), co zapewnia zmniejszenie dawki leku przy zachowaniu tego samego efektu terapeutycznego.
- Krzywe zależności maksimum absorbancji dla ostatniego pasma Q od stężenia testowanego związku mają charakter liniowy. Sugeruje to, iż związek nie ulega agregacji, a dokładniej, że związek podczas przygotowywania kolejnych niższych stężeń nie zmienia stopnia agregacji, który mógł powstać podczas przygotowywania pierwszego roztworu o najwyższym stężeniu.
- Na przykładzie roztworu związku w buforze fosforanowym wykazano, iż związek ulega agregacji w środowisku wodnym. Mianowicie po dodaniu do roztworu chloryny surfaktantu zmienił się kształt widma absorpcji oraz maksima poszczególnych pasm absorpcji. Efekt ten sugeruje, iż związek rozpuszczony w środowisku wodnym na przykładzie buforu ulega agregacji.
- Związek charakteryzuje się fluorescencją przy długości fali około 650 nm. Może być, zatem wykorzystany do lokalizacji zmian chorobowych oraz do oceny skuteczności terapii PDT.
- Zarejestrowane widma ekscytacyjne są podobne do widm absorpcyjnych, co potwierdza czystość chemiczną związku.
- Wartości przesunięcia Stokesa są małe, co prawdopodobnie świadczy o tym, że struktura molekuly w stanie wzbudzonym jest taka sama, jak w stanie podstawowym. Dodatkowo straty energii pomiędzy wzbudzeniem a emisją fluorescencji przez cząsteczki są niewielkie.

- Wartości kwantowej wydajności fluorescencji wynoszą od 3.8% do 40% w zależności od badanego środowiska. Otrzymane wartości potwierdzają, iż związek może być wykorzystywany w diagnostyce PDD (z ang. photodynamic diagnosis) oraz do oceny efektywności terapii fotodynamicznej.
- Krzywa zaniku fluorescencji składa się z czterech komponentów, co prawdopodobnie sugeruje, iż związek występuje w postaci monomerycznej oraz oligomerycznej. Dodatkowo za krótkie czasy życia fluorescencji mogą odpowiadać agregaty powstałe podczas rozpuszczania związku w glicerynie.
- Wyznaczony czas życia molekuł fotouczulacza w stanie trypletowym jest wystarczający do wygenerowania odpowiedniej ilości tlenu singletowego.
- Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego wynosi 55%. W porównaniu do innych związków komercyjnie dostępnych (Photofrin, Foscan), jest to wystarczająca wartość, która może prowadzić do śmierci komórek nowotworowych.
- Badania stabilności potwierdziły, iż związek jest stabilny podczas przechowywania go w miejscu o ograniczonym dostępie światła przez okres 14 dni.
- Na podstawie przeprowadzonego eksperymentu polegającego na naświetlaniu próbki światłem czerwonym o różnych dawkach, zaobserwowano, że związek ulega fotowysbieleniu powyżej dawki 18 J/cm².

Badany związek spełnia kryteria stawiane potencjalnym lekom przeciwnowotworowym, podobnie jak chloryna *c* i *e* (Załącznik 1). Jedynym ograniczeniem wykorzystania tych związków jest ich agregacja w środowisku wodnym, jednakże przy wykorzystaniu nośników liposomowych wadę tę można zminimalizować. W związku z powyższym, chloryny te zostały poddane dalszym badaniom z wykorzystaniem liposomów, jako nośników leków nowotworowych. Ten etap badań rozpoczął od określenia składu błony fosfolipidowej liposomów. Eksperymentom poddano 3 typy liposomów: anionowe, kationowe oraz neutralne. W każdym z tych typów można wyróżnić liposomy stabilizowane sferycznie zawierające w składzie błony fosfolipidowej glikol polietylenowy. Następnym krokiem było określenie podstawowych parametrów fizycznych testowanych liposomów zarówno pustych, jak i ze związkiem zamkniętym w dwuwarstwie fosfolipidowej. Za pomocą analizatora wielkości cząstek, wykorzystującego metodę

dynamicznego rozpraszania światła, wykonano pomiar średnicy liposomów. Przeprowadzając ten pomiar w różnych odstępach czasu od momentu przygotowania zawiesin liposomowych określono ich stabilność podczas przechowywania w miejscu o ograniczony dostęp światła, w temperaturze 3 °C. Następnie wyznaczono procentowo efektywność zamykania fotouczulaczy w dwuwarstwie fosfolipidowej. Eksperyment ten przeprowadzono tylko dla chloryny *e* i *c*, z powodu niewielkiej ilości chloryny *k* do badań. W ostatniej części tego etapu badań wykonano eksperymenty na komórkach nowotworowych. Za pomocą testu MTS, pozwalającego ocenić przeżywalność komórek, określono toksyczność ciemną pustych liposomów, liposomów z testowanym związkiem oraz badanych fotouczulaczy. Przy wykorzystaniu tego testu oceniono również efekt terapeutyczny otrzymany po terapii fotodynamicznej przeprowadzonej po zaaplikowaniu komórkom nowotworowym fotouczulacza oraz kompleksu liposom-lek.

Powyższe eksperymenty pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Wartości współczynnika polidispersyjności testowanych liposomów nie przekraczają 0.14. Zgodnie z przyjętym kryterium badane zawiesiny liposomów są mieszaninami jednorodnymi, gdyż wartość PDI nie przekracza 0.3.
- Badane liposomy posiadają średnicę poniżej 170 nm. Uwzględniając morfologię guza nowotworowego oraz fakt, że jest on zaopatrywany przez nieszczelne naczynia krwionośne ułatwiające migrację cząstek w zakresie od 100 do 400 nm, testowane liposomy mogą być wykorzystywane do transportu leków w terapii PDT.
- Stabilność podczas przechowywania w temperaturze 3 °C w miejscu o ograniczonym dostępie światła przez okres 28 dni wykazują liposomy neutralne, zarówno z cholesterolem, jak i z glikolem polietylenowym. Pozostałe liposomy charakteryzują się mniejszą stabilnością. W celu uniknięcia agregacji lub też wycieku leku z błony fosfolipidowej należy przygotowywać je bezpośrednio przed podaniem.
- Testowane liposomy charakteryzują się wysoką efektywnością zamykania leku, która wynosi ponad 80%. W przypadku chloryny *e* największą efektywność uzyskano dla liposomów anionowych DPPC/DPPG (95%), natomiast dla chloryny *c* dla liposomów neutralnych HSPC/Chol (96%).

- Zarówno badane związki, jak i liposomy oraz kompleksy liposom-lek są nietoksyczne dla komórek nowotworowych. Przy braku światła po 4 godzinnej inkubacji nie zaobserwowano wpływu testowanych grup na proliferację komórek. Jedynie niewielka toksyczność występuje dla liposomów neutralnych z glikolem polietylenowym zawierającym chlorynę *e* o stężeniu 1 μ M. W tym przypadku przeżywalność komórek maleje aż do 88%.
- Efekt fotodynamiczny uzyskany dla chloryny *e* wskazuje, że związek zamknięty w nośnikach liposomowych jest skuteczniejszy niż w postaci wolnej. Podobne relacje otrzymano dla chloryny *c*, jednakże w tym przypadku efekt ten występuje tylko przy niskich stężeniach związku (0.5 i 1 μ M). Niestety chloryna *k* zarówno w postaci wolnej, jak i zamkniętej w nośnikach liposomowych charakteryzuje się niską efektywnością niszczenia komórek nowotworowych.

Z przeprowadzonych na liposomach badań wynika, iż posiadają one odpowiednie parametry fizyczne i mogą być wykorzystywane do transportu fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej. Niska stabilność niektórych typów liposomów wymaga, krótszego czasu przechowywania lub też przygotowania bezpośrednio przed podaniem. Na przykładzie chloryny *e* i *c* widać, iż zaproponowane nośniki liposomowe zwiększają efektywność terapii fotodynamicznej. Słaby efekt fotodynamiczny w przypadku chloryny *k* może być spowodowany obecnością długiego hydrofobowego łańcucha węglowodorowego składającego się z 15 atomów węgla.

Eksperymenty wykonywane w ramach niniejszej pracy doktorskiej miały charakter interdyscyplinarny i łączyły w sobie elementy fizyki, chemii oraz biologii. Pozwoliły one na sformułowanie wniosków, które będą stanowić źródło wiedzy do dalszych rozważań na temat wykorzystania liposomów, jako nośników fotouczulaczy na przykładzie chloryn. Praca jest punktem wyjścia do zaplanowania kolejnych etapów badań, które mogą obejmować określenie między innymi stabilności liposomów w osoczu ludzkim, czy też eksperymentów *in vivo*.

VI. LITERATURA

1. International Agency for Research on Cancer: *Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed* [Online], [dostęp: 01 stycznia 2015] Dostępny w Internecie: http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf
2. A. Graczykova: *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*. Warszawa: Dom Wydawniczy Bellona, 1999.
3. K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich: *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*. Lasers in Medical Science. 2009, 24, 259-268.
4. A.C. Kübler: *Photodynamic therapy*. Medical Laser Application. 2005, 20, 37-45.
5. M.T. Wan, J.Y. Lin: *Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology*. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. 2014, 7, 145-163.
6. L.M. Moreira, J.P. Lyon, A.P. Romani, D. Severino, M.R. Rodrigues, H.P.M. de Oliveria: *Phenothiazinium dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT): spectroscopic properties and photochemical mechanisms*. M.A. Farrukh. Advanced aspects of spectroscopy. INTECH, 2012.
7. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk: *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 2004.
8. A. Chiaviello, I. Postiglione, G. Palumbo: *Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: a brief overview*. Cancers. 2011, 3, 1014-1041.
9. R.P. Smith: *Photodynamic therapy*. Current Problems in Cancer. 2002, 26, 61-108.
10. P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick et al.: *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2011, 61, 250-281.

11. S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S. Ogura, A. Ikeda et al.: *Current states and future views in photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. 2011, 12, 46-67.
12. R. Mensudar: *Photodynamic therapy – a review*. World Journal of Medical Sciences. 2014, 10, 139-142.
13. C.A. Robertson, D.H. Evans, H. Abrahamse: *Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2009, 96, 1-8.
14. A.B. Ormond, H.S. Freeman: *Dye sensitizers for photodynamic therapy*. Materials. 2013, 6, 817-840.
15. R. Bonnett: *Chemical aspects of photodynamic therapy*. London: Gordon and Breach Science Publishers, 2000.
16. D. Nowis, M. Makowski, P. Mróz, P. Mrówka, T. Issat, J. Gietka et al.: *Fotodynamiczna terapia nowotworów*. Magazyn Otolaryngologiczny. 2003, 4, 93-101.
17. T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik et al.: *Photodynamic therapy*. Journal of National Cancer Institute. 1998, 90, 889-905.
18. J. Safari, Z. Zarnegar: *Advanced drug delivery system: nanotechnology of health design a review*. Journal of Saudi Chemical Society. 2014, 18, 85-99.
19. J. Peng, Q. Moan: *An outline of the history of PDT*. T. Patrice: *Photodynamic therapy*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003.
20. S.A. Sibani, P.A. McCarron, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly: *Photosensitiser delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms*. Expert Opinion on Drug Delivery. 2008, 5, 1241-1254.
21. S.S. Lucky, K.C. Soo, Y. Zhang: *Nanoparticles in photodynamic therapy*. Chemical Reviews. 2015, 115, 1990-2042.
22. R.R. Allison, C.H. Sibata: *Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2010, 7, 61-75.
23. Y. Huang, A.C.H. Chen, M. Hamblin: *Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm*. SPIE International Society for optics and photonics. 2009,

DOI 10.1117/2.1200906.1669 [Online], [dostęp: 30 listopada 2014] Dostępny w Internecie: <http://spie.org/x35504.xml>

24. T. Vo-Dinh: *Biomedical photonics handbook*. New York: CRC PRESS, 2003.
25. R.V. Bensasson, E.J. Land, T.G. Truscott: *Excited states and free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press Inc., 1993.
26. Lakowicz, J.R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Baltimore: Springer Science & Business Media, 2006.
27. A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin: *Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2004, 1, 279-293.
28. A. Nowak-Stępniewska, P. Pergoń, A. Padzik-Graczyk: *Metoda fotodynamiczna diagnostyki i leczenia nowotworów — mechanizmy i zastosowania*. Postępy Biochemii. 2013, 59, 53-63.
29. D. Nowis, M. Makowski, T. Stokłosa, M. Legat, T. Issat, J. Gołąb: *Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy*. Acta Biochimica Polonica. 2005, 52, 339-352.
30. R.R. Allison, G.H. Downie, R. Cuenca, X. Hu, C.J.H. Childs, C.H. Sibata: *Photosensitizers in clinical PDT*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2004, 1, 27-42.
31. K.A. Al-Khaza'leh, K. Omar, M.S. Jaafar: *Photobleaching of Sn(IV) chlorine e6 dichloride trisodium salt in different environments*. African Journal of Biotechnology. 2011, 10, 9137-9147.
32. P. Agostinis, E. Buytaert, H. Breyssnes, N. Hendrickx: *Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis*. Photochemical and Photobiological Sciences. 2004, 3, 721-729.
33. B.C. Wilson, M.S. Patterson: *The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy*. Physics in Medicine and Biology. 2008, 9, R61-R109.
34. M. Hamblin, P. Mróz: *Advances in Photodynamic Therapy: basic, translational and clinical*. Norwood: Artech House, 2008.

35. G. Stochel, M. Brindell, W. Macyk, Z. Stasicka, K. Szaciłowski: *Bioinorganic Photochemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.
36. Graczyk, A: *Fotodynamiczna metoda w zastosowaniach onkologicznych*. M. Nałęcz: *Fizyka medyczna*. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2002.
37. A.E. O'Connor, W.M. Gallagher, A.T. Byrne: *Porphyrin and norporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy*. *Photochemistry and Photobiology*. 2009, 85, 1053-1074.
38. R.R. Allison, K. Moghissi: *Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms*. *Clinical Endoscopy*. 2013, 46, 24-29.
39. E. Paszko, C. Ehrhardt, M.O. Senge, D.P. Kelleher, J.V. Reynolds: *Nanodrug applications in photodynamic therapy*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011, 8, 14-29.
40. M.O. Senge, J.C. Brandt: *Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) – a second-generation photosensitizer*. *Photochemistry and Photobiology*. 2011, 87, 1240-1296.
41. A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin: *Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005, 2, 1-23.
42. P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin: *Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer*. *Cancers*. 2011, 3, 2516-2539.
43. S.O. Gollnick, C.M. Brackett: *Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy*. *Immunologic Research*. 2010, 46, 216-226.
44. W. Li, Q. Ma, E. Wu: *Prespectives on the role of photodynamic therapy in the treatment of pancreatic cancer*. *International Journal of Photoenergy*. 2012, DOI 10.1155/2012/637429 [Online], [dostęp: 30 listopada 2014] Dostępny w Internecie: <http://www.hindawi.com/journals/ijp/2012/637429/>
45. A.D. Garg, D. Nowis, J. Golab, P. Agostinis: *Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity*. *Apoptosis*. 2010, 15, 1050-1071.

46. H. Rode: *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Poliferation*. Germany: Roche Diagnostics GmbH, 2008.
47. G.M. Fuller, D. Shield: *Podstawy molekularne biologii komórki*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2000.
48. A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin: *Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2005, 2, 91-106.
49. P. Mroz, Y. Huang, M.R. Hamblin: *Photodynamic therapy for cancer and activation of immune response*. SPIE Biophotonics and Immune Responses. 2010, DOI 10.1117/12.841031 [Online], [dostęp: 30 listopada 2014] Dostępny w Internecie: <http://hdl.handle.net/1721.1/58550>
50. T. Osmalek, T. Gośliński, J. Mielcarek, E. Osmalek: *Nowe tendencje oraz bezpieczeństwo terapii fotodynamicznej*. Przegląd Lekarski. 2012, 69, 1205-1208.
51. L.A. Muehlmann, G.A. Joanitti, J.R. Silva, J.P.F. Longo, R.B. Azevedo: *Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2011, 44, 729-737.
52. D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M. Viriot, F. Guillemin, M. Berberi-Heyob: *Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents*. Trends in Biotechnology. 2008, 26, 612-621.
53. D.K. Chatterjee, L.S. Fong, Y. Zhang: *Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2008, 60, 1627-1637.
54. S. Wang, R. Gao, F. Zhou, M. Selke: *Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy*. Journal of Materials Chemistry. 2004, 14, 487-493.
55. S. Biswas, V.P. Torchilin: *Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2014, 66, 26-41.
56. N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad: *Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2014, 66, 2-25.

57. J. Pucińska, H. Podbielska: *Nanomateriały we wspomaganiu terapii fotodynamicznej*. Acta Bio-Optica et Informatica Medica. 2009, 15, 178-181.
58. A. Puri: *Phototriggerable liposomes: current research and future perspectives*. Pharmaceutics. 2014, 6, 1-25.
59. K. Nawalany, A. Rusin, M. Kępczyński, A. Mikhailov, G. Kramer-Marek, M. Śnietura et al.: *Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes: in vitro studies*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2009, 97, 8-17.
60. P. Peng, R. Hong, Y. Tsai, P. Li, T. Tsai, C. Chen: *Dual-effect liposomes encapsulated with doxorubicin and chlorin e6 augment the therapeutic effect of tumor treatment*. Laser in Surgery and Medicine. 2015, 47, 77-87.
61. J. Zhong, L.C. Dai: *Targeting liposomal nanomedicine to cancer therapy*. Technology in Cancer Research and Treatment. 2012, 11, 475-481.
62. J.S. Dua, A.C.Rana, A.K. Bhandari: *Liposome: methods of preparation and applications*. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research. 2012, 3, 14-20.
63. K.P.S. Kumar, D. Bhowmik, L. Deb: *Recent trends in liposomes used as novel drug delivery system*. The Pharma Innovation. 2012, 3, 29-38.
64. H. Anwekar, S. Patel, A.K. Singhai: *Liposome – as drug carries*. International Journal of Pharmacy and Life Sciences. 2011, 2, 945-951.
65. T. Lian, R.J.Y. Ho: *Trends and developments in liposome drug delivery system*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2001, 90, 667-680.
66. A. Samad, Y. Sultana, M. Aqil: *Liposomal drug delivery system: an update review*. Current Drug Delivery. 2007, 4, 297-305.
67. A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. Woo Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour et al.: *Liposome: classification, preparation, and applications*. Nanoscale Research Letters. 2013, 8, 1-9.
68. K. Shashi, K. Satinder, P. Bharat: *A complete review on: liposomes*. International Research Journal of Pharmacy. 2012, 3, 10-16.

69. L. Kaur, P. Kaur, M.U. Khan: *Liposomes as a drug carrier – a review*. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry. 2013, 3, 121-128.
70. M.M. Amiji: *Nanotechnology of cancer therapy*. New York: CRC Press, 2006.
71. J. Gubernator: *Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity*. Expert Opinion on Drug Delivery. 2011, 8, 565-580.
72. G. Storm, D.J.A. Crommelin: *Liposomes: quo vadis?*. PSTT. 1998, 1, 19-31.
73. V.P. Torchilin: *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nature Reviews Drug Discovery. 2005, 4, 145-160.
74. M.A. Mansoori, S. Agrawal, S. Jawade, M.I. Khan: *A review on liposome*. International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Bio Sciences. 2012, 2, 453-464.
75. A.S. Ulrich: *Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles*. Bioscience Reports. 2002, 22, 129-150.
76. A. Kozubek: *Wstęp do technologii liposomowej*. Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 2004.
77. V.K. Sharma, D.N. Mishra, A.K. Sharma, B. Srivastava: *Liposomes: present prospective and future challenges*. International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research. 2010, 1, 6-16.
78. W. Fabianowski: *Liposomy – otrzymywanie, własności, transport i uwalnianie aktywnych substancji*. Wiadomości PTK. 2002, 5, 21-24.
79. D.D. Lasic: *Novel applications of liposomes*. Trends in Biotechnology. 1998, 16, 307-321.
80. A. Sharma, U.S. Sharma: *Liposomes in drug delivery: progress and limitations*. International Journal of Pharmaceutics. 1997, 154, 123-140.
81. S. Bibi, E. Lattmann, A.R. Mohammed, Y. Perrie: *Trigger release liposome systems: local and remote controlled delivery?*. Journal of Microencapsulation. 2012, 29, 262-276.
82. P.R. Kulkarni, J.D. Yadav, K.A. Vaidya: *Liposomes: a novel drug delivery system*. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2011, 3, 10-18.

83. A.S.L. Derycke, P.A.M. de Witte: *Liposomes for photodynamic therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2004, 56, 17-30.
84. D.D. Lasic, D. Papahadjopoulos: *Medical applications of liposomes*. Amsterdam: Elsevier, 1998.
85. K. Stebelska, P. Wyrozumska, M. Grzybek, A. Sikorski: *Charakterystyka i medyczne zastosowania konstrukcji liposomowych*. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2002, 2, 229-242.
86. D.K. Martin: *Nanobiotechnology of biomimetic membranes*. New York: Springer, 2007.
87. C. Allen, N. Dos Santos, R. Gallagher, G.N.C. Chiu, Y. Shu, W.M. Li et al.: *Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol)*. Bioscience Reports. 2002, 22, 225-250.
88. A.B.M. Sipai, Y. Vandana, Y. Mamatha, V.V. Prasanth: *Liposomes: an overview*. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation. 2012, 1, 13-21.
89. C. Tikshdeep, A. Sonia, P. Bharat, C. Abhishek: *Liposome drug delivery: a review*. International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences. 2012, 1, 754-764.
90. S.C. Basu, M. Basu: *Methods in molecular biology: Liposome methods and protocols*. New Jersey: Humana Press, 2002.
91. N. Düzgünes: *Methods in enzymology. Liposomes, part E*. Pasadena, California: Elsevier, 2005.
92. T.M. Allen, P.R. Cullis: *Liposomal drug delivery system: from concept to clinical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2013, 65, 36-48.
93. H. Chang, M. Yeh: *Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization and therapeutic efficacy*. International Journal of Nanomedicine. 2012, 7, 49-60.
94. A. Kozubek, J. Gubernator, E. Przeworska, M. Stasiuk: *Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes*. Acta Biochimica Polonica. 2000, 47, 639-649.

95. M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M.T. Gandolfu: *Handbook of Photochemistry*. New York: CRC Press, 2006.
96. S. Murov, I. Carmichael, G. Hug: *Handbook of photochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1993.
97. Marzena Rams-Baron: *Poszukiwanie aktywnych związków fotouczulających pod kątem ich aplikacji w fotodynamicznej diagnostyce i terapii nowotworowej*. Katowice: Uniwersytet Śląski, 2012 – rozprawa doktorska.
98. A.Z. Hryniewicz, E. Rokita: *Fizyczne metody diagnostyki medycznej i terapii*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
99. A. Kozik, M. Rapała-Kozik, I. Guevara-Lora: *Analiza instrumentalna w biochemii*. Kraków: Instytut Biologii Molekularnej UJ, Wydawnictwo "EJB", 2001.
100. T. Nowicka-Jankowska, E. Wieteska, K. Gorczyńska, A. Michalik: *Spektrofotometria UV/VIS w analizie chemicznej*. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 1988.
101. Y. Hu, P. Geissinger, J.C. Woehl: *Potential of protoporphyrin IX and metal derivatives for single molecule fluorescence studies*. Journal of Luminescence. 2011, 131, 477-481.
102. A.T. Williams, S.A. Winfield, J.N. Miller: *Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer*. Analyst. 1983, 108, 1067-1071.
103. C.J.P. Monteiro, M.M. Pereira, M.E. Azenha, H.D. Burrows, C. Serpa, L.G. Arnaut et al.: *A comparative study of water soluble 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfophenyl)porphyrin and its metal complexes as efficient sensitizers for photodegradation of phenols*. Photochemical and Photobiological Sciences. 2005, 4, 617-624.
104. A. Turek, J. Najbar: *Fotochemia i spektroskopia optyczna*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009.
105. M.C. DeRosa, R.J. Crutchley: *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. Coordination Chemistry Reviews. 2002, 233-234, 351-371.

106. F. Wilkinson, W.P. Helman, A.B. Ross: *Quantum yields of the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution*. Journal of Physical and Chemical Reference Data. 1993, 22, 113-262.
107. E.F.F. Silva, F.A. Schaberle, C.J. Monteiro, J.M. Dąbrowski, L.G. Arnaut: *The challenging combination of intense fluorescence and high singlet oxygen quantum yield in photostable chlorins – a contribution to theranostics*. Photochemical and Photobiological Sciences. 2013, 12, 1187-1192.
108. L.A. Martinez, C.G. Martinez, B.B. Klopotek, J. Lang, A. Neuner, A.M. Braun et al.: *Nonradiative and radiative deactivation of singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) in micellar media and microemulsions*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2000, 58, 94-107.
109. M. Legut, D. Lipka, N. Filipczak, A. Piwoni, A. Kozubek, J. Gubernator: *Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines – in vitro studies*. International Journal of Nanomedicine. 2014, 9, 653-668.
110. Promega i Bulletin: *Technical. CellTriter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*. [Online], [dostęp: 17 grudnia 2014] Dostępny w Internecie: www.promega.com
111. M. Gouterman: *Spectra of porphyrins*. Journal of Molecular Spectroscopy. 1961, 6, 138-163.
112. M.S. Zakerhamidi, Adam. Ghanadzadeh, M. Moghadam: *Solvent effects on the UV/Visible absorption spectra of some aminoazobenzene dyes*. Chemical Science Transactions. 2012, 1, 1-8.
113. M. Homocianu, A. Airinei, D.O. Dorohoi: *Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra*. Journal of Advanced Research in Physics. 2011, 2, 1-9.
114. J. Kulbacka, D. Boehm, A. Chwilkowska, J. Saczko, T. Banaś: *The influence of media polarity and red light on Photofrin II and Hypericin*. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2004, 13, 897-901.

115. A.F. Uchoa, K.T. de Oliveira, M.S. Baptista, A.J. Bortoluzzi, Y. Iamamoto, O.A. Serra: *Chlorin photosensitizers sterically designed to prevent self-aggregation*. The Journal of Organic Chemistry. 2011, 76, 8824-8832.
116. P. Shubhajit, P. Heng, L. Chan: *Optimization in solvent selection for chlorin e6 in photodynamic therapy*. Journal of Fluorescence. 2013, 23, 283-291.
117. Y. Yang, C. Chen, T. Tsai: *Absorption and fluorescence spectral properties of hematoporphyrin in liposomes, micelles and nanoparticles*. Dyes and Pigments. 2013, 96, 763-769.
118. D. Bauer, F.P. Montforts, A. Losi, H. Görner: *Photoprocessess of Chlorin e6 glucose derivatives*. Photochemical & Photobiological Sciences. 2011, 11, 925-930.
119. M. Lovčinský, J. Borecký, P. Kubát, P. Ježek: *Meso-tetraphenylporphyrin in liposomes as a suitable photosensitizer for photodynamic therapy of tumors*. General Physiology and Biophysics. 1999, 18, 107-118.
120. I.T.I. Gupta, M. Ravikanth: *Fluorescence properties of meso-tetrafurylporphyrins*. Journal of Chemical Sciences. 2005, 117, 161-166.
121. G. Kramer-Marek, C. Serpa, A. Szurko, M. Widel, A. Sochanik, M. Sniatura et al.: *Spectroscopic properties and photodynamic effects of new lipophilic porphyrin derivatives: Efficacy, localisation and cell death pathways*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2006, 84, 1-14.
122. J.A. Russell, K.R. Diamond, T.J. Collins, H.F. Tiedje, J.E. Hayward, T.J. Farrell et al.: *Characterization of fluorescence lifetime of Photofrin and Delta-Aminolevulinic acid induced Protoporphyrin IX in living cells using Single- and two-photon excitation*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. 2008, 14, 158-166.
123. R.M. Rich, D.L. Stankowska, B.P. Maliwal, T.J. Sørensen, B.W. Laursen, R.R. Krishnamoorthy et al.: *Elimination of autofluorescence background from fluorescence tissue images by use of time-gated detection and the AzaDiOxaTriAngulenium (ADOTA) fluorophore*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2013, 405, 2065-2075.
124. R. Cubeddu, D. Comelli, C. D'Andrea, P. Taroni, G. Valentini: *Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine*. Journal of Physics D: Applied Physics. 2002, 35, R61-R76.

125. J. Menezes, M. Amparo, F. Faustino, K. de Oliveira, M. Uliana, V. Ferreira et al.: *Synthesis of new chlorin e6 trimethyl and protoporphyrin IX dimethyl ester derivatives and their photophysical and electrochemical characterizations*. Chemistry: A European Journal. 2014, 20, 13644-13655.
126. S.A. Yeh, K.R. Diamond, M.S. Patterson, Z. Nie, J.E. Hayward, Q. Fang: *Monitoring photosensitizer uptake using two photon fluorescence lifetime imaging microscopy*. Theranostics. 2012, 2, 817-826.
127. H. Yang, Z. Zhang, Z. Han, S. Yao: *An investigation of the triplet state of pheophorbide a using laser flash photolysis*. Dyes and Pigments. 2000, 46, 139-143.
128. P. Nowak-Sliwinska, A. Karocki, M. Elas, A. Pawlak, G. Stochel, K. Urbanska: *Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006, 349, 549-555.
129. J.M. Dąbrowski, L.G. Arnaut, M.M. Pereira, K. Urbńska, S. Simões, G. Stochel et al.: *Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy in vitro*. Free Radical Biology and Medicine. 2012, 52, 1188-1200.
130. Janusz Dąbrowski: *Nowe halogenowe fotosensybilizatory tetrapiolowe do terapii fotodynamicznej nowotworów*. Kraków: Uniwersytet Jagielloński, 2009 – rozprawa doktorska.
131. B. Bonnett, P. Charlesworth, B.D. Djelal, S. Foley, D.J. McGarvey, T.G. Truscott: *Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)-porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions . 1999, 2, 325–328.
132. F. Wilkinson, W.P. Helman, A.B. Ross: *Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation*. Journal of Physical and Chemical Reference Data. 1995, 24, 663-1021.

133. S. Dad, R.H. Bisby, I.P. Clark, A.W. Parker: *Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E*. Free Radical Research. 2006, 40, 333-338.
134. D. Bryce-Smith: *Photochemistry*. London: Royal Society of Chemistry, 1974.
135. M.K. Kuimova, H.A. Collins, M. Balaz, E. Dahlstedt, J.A. Levitt, N. Sergent et al.: *Photophysical properties and intracellular imaging of water-soluble porphyrin dimers for two-photon excited photodynamic therapy*. Organic & Biomolecular Chemistry. 2009, 7, 889-896.
136. R. Rotomskis, G. Streckyte, S. Bagdonas: *Phototransformations of sensitizers; 1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1997, 39, 167-171.
137. K. Das, A. Dube, P.K. Gupta: *A spectroscopic study of photobleaching of chlorin p6 in different environments*. Dyes and Pigments. 2005, 64, 201-205.
138. I. Belitchenko, V. Melnikova, L. Bezdetnaya, H. Rezzoug, J.L. Merlin, A. Potapenko et al.: *Characterization of photodegradation of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) in solution: biological consequences in human tumor cells*. Photochemistry and Photobiology. 1998, 67, 584-590.
139. C. Hajdur, N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van den Bergh, G. Wagnières: *Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1998, 45, 170-178.
140. M. Badran, K. Shalaby, A. Al-Omrani: *Influence of the flexible liposomes on the skin deposition of a hydrophilic model drug, carboxyfluorescein: dependency on their composition*. The Scientific World Journal. 2012, 2012, 1-9.
141. N. Drgicevic-Curic, S. Gräfe, B. Gitter, S. Winter, A. Fahr: *Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: in vitro skin penetration studies and stability*. International Journal of Pharmaceutics. 2010, 384, 100-108.
142. G. Meerovich, I. Meerovich, E. Lukyanets, N. Obototova, V. Derkacheva, Z. Smirnova et al.: *Influence of liposome size on accumulation in tumor and therapeutic*

efficiency of liposomal near-IR photosensitizer for PDT based on aluminium hydroxide tetra-3-phenylthiophtalocyanine. Boston: Nanotech – Konferencja, 2008.

143. V.D. Awasthi, D. Garcia, B.A. Goins, W.T. Phillips: *Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits*. International Journal of Pharmaceutics. 2003, 253, 121-132.

144. T. Kiesslich, J. Berlanda, K. Plaetzer, B. Krammer, F. Berr: *Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan – and Foslip – based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines*. Photochemical and Photobiological Sciences. 2007, 6, 619-627.

145. C. Compagnin, F. Moret, L. Celotti, G. Miotto, J.H. Woodhams, A.J. MacRobert et al.: *Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-loaded liposomes sterically stabilised with poly(ethylene glycol) of different lenght and density: characterization, in vitro cellular uptake and phototoxicity*. Photochemical and Photobiological Sciences. 2011, 10, 1751-1759.

146. F. Moret, D. Scheglmann, E. Reddi: *Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin (m-THPC)*. Photochemistry and Photobiological Sciences. 2013, 12, 823-834.

147. A. Polanowski: *Laboratorium z biochemii dla studentów biologii, biotechnologii i ochrony środowiska*. Wrocław: Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski, 2005.

148. D. Nowis, T. Stokłosa, M. Legat, T. Issat, M. Jakóbisiak, J. Gołąb: *The influence of photodynamic therapy on the immune response*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2005, 2, 283-298.

VII. WYKAZ RYSUNKÓW

I. WSTĘP TEORETYCZNY

- Rysunek 1:** Schemat postępowania w terapii fotodynamicznej. str. 13
- Rysunek 2:** Okno optyczne tkanek; Hb – hemoglobina, HbO₂ – oksyhemoglobina [23]. str. 14
- Rysunek 3:** Schemat Jabłońskiego z uwzględnieniem procesów fotochemicznych zachodzących podczas terapii PDT. $h\nu$ – kwant świetlny pochłaniany przez cząsteczkę fotouczulacza; A – absorpcja; FL – fluorescencja; P – fosforescencja; IC – konwersja wewnętrzna; ISC – przejście międzysystemowe; VR – relaksacja wibracyjna [11, 24-27]. str. 14
- Rysunek 4:** Reakcje fotochemiczne zachodzące podczas przebiegu terapii fotodynamicznej. 1F_0 – fotouczulacz w podstawowym stanie singletowym; $h\nu$ – kwant świetlny pochłaniany przez cząsteczkę fotouczulacza; $^1F^*$ – fotouczulacz w singletowym stanie wzbudzonym; $^3F^*$ – fotouczulacz we wzbudzonym stanie trypletowym; ISC – przejście międzysystemowe; RH – substrat; FH^\bullet – rodnik fotouczulacza; R^\bullet – rodnik substratu; $F^{\bullet-}$ – anionorodnik fotouczulacza; $RH^{\bullet-}$ – anionorodnik substratu; 3O_2 – tlen molekularny w stanie trypletowym; HO_2^\bullet – rodnik wodorotlenkowy; $O_2^{\bullet-}$ – anionorodnik nadutlenkowy; O_2 – tlen molekularny w stanie singletowym; O_2^{2-} – anion nadutlenkowy; SOD – dysmutaza nadutlenkowa; H_2O_2 – nadtlenek wodoru [2, 3, 28]. str. 17
- Rysunek 5:** Formy tlenu singletowego [28]. str. 18
- Rysunek 6:** Struktury chemiczne fotouczulaczy [14]. str. 21
- Rysunek 7:** Struktura liposomu zbudowanego z jednej dwuwarstwy fosfolipidowej otaczającej rdzeń wodny [64]. str. 31
- Rysunek 8:** Ogólna struktura fosfolipidów. R_1 ; R_2 – łańcuchy kwasów tłuszczowych; R_3 – grupa hydrofilowa [65]. str. 32
- Rysunek 9:** Możliwe interakcje liposomów zawierających lek z komórką: specyficzna (a) lub niespecyficzna (b) absorpcja liposomów na powierzchni komórki; fuzja liposomów z błoną komórkową (c) i uwolnienie zawartości bezpośrednio do cytoplazmy; destabilizacja liposomów przez pewne składniki błony komórkowej (d) i проникnięcie uwolnionego leku do komórki poprzez mikropinocytozę; bezpośrednia lub pośrednia przy wykorzystaniu białek wymiana składników lipidowych pomiędzy liposomami a błoną komórkową (e); specyficzna lub niespecyficzna endocytoza (f) – liposomy mogą być dostarczane za pomocą endosomu do lizosomu (g) lub liposom może powodować destabilizację endosomu (h) w obu przypadkach lek transportowany przez nośnik uwalniany jest do cytoplazmy [73]. str. 42

III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

- Rysunek 10:** Struktury chemiczne badanych fotouculaczy: A) chloryna *k* str. 50
 $C_{62}H_{97}N_7O_{13}$ ($M = 1148.47$ g/mol); B) chloryna *e* $C_{35}H_{38}N_4O_6$
($M = 610.70$ g/mol); C) chloryna *c* $C_{45}H_{60}N_6O_{12}$
($M = 876.99$ g/mol).
- Rysunek 11:** Konwersja soli błękitu tetrazolowego do barwnego formazanu str. 63
[110].

VIII. WYKAZ TABEL

I. WSTĘP TEORETYCZNY

Tabela 1:	Charakterystyka wybranych fotouczulaczy zatwierdzonych do leczenia różnych typów nowotworów oraz będących w fazie prób klinicznych [3, 8, 10, 11, 14, 21, 22, 29, 37, 38].	str. 23
Tabela 2:	Charakterystyka wybranych fotouczulaczy nieporfirynowych [14, 37, 39].	str. 26
Tabela 3:	Formulacje liposomowe leków dostępne komercyjnie [65, 66, 74, 89, 92-94].	str. 45

III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

Tabela 4:	Rozpuszczalniki stosowane w badaniach [95, 96].	str. 48
Tabela 5:	Lipidy użyte do preparatyki liposomów.	str. 48
Tabela 6:	Skład lipidowy poszczególnych liposomów wykorzystywanych do badań.	str. 52

IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

Tabela 7:	Położenia pasm absorpcji oraz wartości molowego współczynnika absorpcji dla chl <i>k</i> .	str. 68
Tabela 8:	Położenia pasm emisji i ostatniego pasma Q, wartości przesunięcia Stokesa oraz energii stanu singletowego wyznaczone dla chl <i>k</i> .	str. 76
Tabela 9:	Wartości kwantowej wydajności fluorescencji otrzymane dla chl <i>k</i> .	str. 79
Tabela 10:	Czasy życia fluorescencji uzyskane dla roztworu chl <i>k</i> w glicerynie.	str. 80
Tabela 11:	Średnie czasy życia molekuł fotouczulacza w stanie trypletowych oraz stała szybkości wygaszania dla roztworu chl <i>k</i> w metanolu.	str. 87
Tabela 12:	Kwantowe wydajności generowania tlenu singletowego dla różnych związków rozpuszczonych w metanolu (^a [131], ^b [128]).	str. 89
Tabela 13:	Czasy naświetlania, dawki światła oraz wartości absorbancji odczytane dla ostatniego pasma Q – 642 nm badanego związku.	str. 94
Tabela 14:	Wartości średnicy oraz współczynnika polidispersyjności dla badanych liposomów.	str. 95
Tabela 15:	Efektywność zamykania (<i>EE</i>) chloryn <i>e</i> i <i>c</i> w nośnikach liposomowych.	str. 103

ZAŁĄCZNIK 1

Tabela 16:	Położenia pasm absorpcji oraz wartości molowego współczynnika absorpcji dla badanych związków rozpuszczonych w dimetylosulfotlenku [97].	str. 143
Tabela 17:	Położenia pasm emisji, wartości przesunięcia Stokesa oraz energii stanu singletowego wyznaczone dla badanych związków rozpuszczonych w dimetylosulfotlenku [97].	str. 143
Tabela 18:	Wartości kwantowej wydajności fluorescencji otrzymane dla badanych związków rozpuszczonych w etanolu [97].	str. 143
Tabela 19:	Średnie czasy życia molekuł fotouczulacza w stanie trypletowym oraz stała szybkości wygaszania dla badanych związków rozpuszczonych w etanolu [97].	str. 143
Tabela 20:	Kwantowe wydajności generowania tlenu singletowego dla badanych związków rozpuszczonych w etanolu [97].	str. 144

IX. WYKAZ WYKRESÓW

IV. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

Wykres 1:	Widmo absorpcyjne roztworu chl <i>k</i> w metanolu.	str. 66
Wykres 2:	Widmo absorpcyjne roztworu chl <i>k</i> w chloroformie.	str. 67
Wykres 3:	Widmo absorpcyjne roztworu chl <i>k</i> w dimetylosulfotlenku.	str. 67
Wykres 4:	Widmo absorpcyjne roztworu chl <i>k</i> w glicerynie (stężenie 5 μ M).	str. 68
Wykres 5:	Krzywa zależności wartości absorbancji ostatniego pasma Q (640 nm) od stężenia fotouczulacza dla roztworu chl <i>k</i> w metanolu.	str. 70
Wykres 6:	Krzywa zależności wartości absorbancji ostatniego pasma Q (644 nm) od stężenia fotouczulacza dla roztworu chl <i>k</i> w chloroformie.	str. 70
Wykres 7:	Krzywa zależności wartości absorbancji ostatniego pasma Q (642 nm) od stężenia fotouczulacza dla roztworu chl <i>k</i> w dimetylosulfotlenku.	str. 71
Wykres 8:	Widma absorpcyjne chl <i>k</i> rozpuszczonej w buforze fosforanowym oraz z dodatkiem Tritonu X-100 (stężenie 5 μ M).	str. 72
Wykres 9:	Znormalizowane widmo ekscytacyjne (648 nm) oraz emisyjne (388 nm) dla roztworu chl <i>k</i> o stężeniu 6.25 μ M w metanolu.	str. 74
Wykres 10:	Znormalizowane widmo ekscytacyjne (648 nm) oraz emisyjne (394 nm) dla roztworu chl <i>k</i> o stężeniu 6.25 μ M w chloroformie.	str. 74
Wykres 11:	Znormalizowane widmo ekscytacyjne (649 nm) oraz emisyjne (392 nm) dla roztworu chl <i>k</i> o stężeniu 6.25 μ M w dimetylosulfotlenku.	str. 75
Wykres 12:	Znormalizowane widmo ekscytacyjne (645 nm) oraz emisyjne (393 nm) dla roztworu chl <i>k</i> o stężeniu 5 μ M w glicerynie.	str. 75
Wykres 13:	Zależność intensywności integralnej emisji od absorbancji dla wzorca oraz roztworu chl <i>k</i> w metanolu.	str. 77
Wykres 14:	Zależność intensywności integralnej emisji od absorbancji dla wzorca oraz roztworu chl <i>k</i> w chloroformie.	str. 78
Wykres 15:	Zależność intensywności integralnej emisji od absorbancji dla wzorca oraz roztworu chl <i>k</i> w dimetylosulfotlenku.	str. 78
Wykres 16:	Zależność intensywności integralnej emisji od absorbancji dla wzorca oraz roztworu chl <i>k</i> w glicerynie.	str. 79
Wykres 17:	Przykładowa krzywa zaniku fluorescencji roztworu chl <i>k</i> w glicerynie, zarejestrowana przy długości fali 670 nm.	str. 81

Wykres 18:	Widmo absorpcji (A) oraz widmo absorpcji przejściowej tryplet-tryplet (B) zarejestrowane w różnych czasach od momentu wzbudzenia impulsem lasera o długości fali 355 nm dla roztworu chl <i>k</i> w metanolu.	str. 84
Wykres 19:	Kinetyczne krzywe zaniku absorpcji wraz z dopasowaniem zarejestrowane dla chl <i>k</i> w środowisku tlenowym (A) oraz zbliżonym do beztlenowego (B).	str. 86
Wykres 20:	Widmo fosforescencji tlenu singletowego zarejestrowane dla roztworu chl <i>k</i> w metanolu przy różnych czasach od momentu wzbudzenia impulsem laserowym o długości fali 355 nm.	str. 88
Wykres 21:	Krzywe zależności intensywności fosforescencji w chwili czasu $t = 0$ od energii lasera dla fenalenonu oraz chl <i>k</i> .	str. 89
Wykres 22:	Widmo absorpcji roztworu chl <i>k</i> w dimetylosulfotlenku zarejestrowane po różnych czasach od momentu przygotowania próbki (stężenie związku – 25 μM).	str. 91
Wykres 23:	Widma absorpcji roztworu chl <i>k</i> w dimetylosulfotlenku (20 μM) zarejestrowane po różnych czasach naświetlań związku.	str. 92
Wykres 24:	Badanie stabilności pustych liposomów neutralnych A) HSPC/Chol; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 98
Wykres 25:	Badanie stabilności pustych liposomów kationowych A) HSPC/DOTAP/Chol; B) HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 98
Wykres 26:	Badanie stabilności pustych liposomów anionowych A) DPPC/DPPG; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 98
Wykres 27:	Badanie stabilności neutralnych liposomów z chl <i>e</i> A) HSPC/Chol; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 99
Wykres 28:	Badanie stabilności kationowych liposomów z chl <i>e</i> A) HSPC/DOTAP/Chol; B) HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 99
Wykres 29:	Badanie stabilności anionowych liposomów z chl <i>e</i> A) DPPC/DPPG; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 99
Wykres 30:	Badanie stabilności neutralnych liposomów z chl <i>c</i> A) HSPC/Chol; B) HSPC/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 100

Wykres 31:	Badanie stabilności kationowych liposomów z chl <i>c</i> A) HSPC/DOTAP/Chol; B) HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 100
Wykres 32:	Badanie stabilności anionowych liposomów z chl <i>c</i> A) DPPC/DPPG; B) HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 100
Wykres 33:	Badanie stabilności liposomów anionowych DPPC/DPPG z chl <i>k</i> podczas przechowywania w temperaturze 3 °C przez okres 28 dni.	str. 101
Wykres 34:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla badanych fotouczulaczy po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).	str. 104
Wykres 35:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla pustych liposomów po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).	str. 105
Wykres 36:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla liposomów z chl <i>e</i> po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).	str. 106
Wykres 37:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla liposomów z chl <i>c</i> po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).	str. 107
Wykres 38:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla liposomów z chl <i>k</i> po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 (toksyczność ciemna).	str. 108
Wykres 39:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl <i>e</i> oraz jej liposomowych formułacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 4.2 J/cm ² (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.	str. 109
Wykres 40:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl <i>e</i> oraz jej liposomowych formułacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 12.5 J/cm ² (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.	str. 110
Wykres 41:	Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl <i>c</i> oraz jej liposomowych formułacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 4.2 J/cm ² (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.	str. 111

Wykres 42: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl *c* oraz jej liposomowych formulacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 12.5 J/cm² (fototoksyczność). Różnice istotne statystycznie oznaczono *.

str. 112

Wykres 43: Przeżywalność komórek oceniona testem MTS uzyskana dla chl *k* oraz jej liposomowych formulacji po 4 godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi linii HCT116 i dawce światła 12.5 J/cm² (fototoksyczność).

str. 113

ZALĄCZNIK 2

Wykres 44: Krzywa kalibracyjna dla roztworu chl *e* w etanolu.

str. 146

Wykres 45: Krzywa kalibracyjna dla roztworu chl *c* w etanolu.

str. 146

ZALĄCZNIK 3

Wykres 46: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/Chol (7:3).

str. 148

Wykres 47: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DSPE-PEG 2000 (9.5:0.5).

str. 149

Wykres 48: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DOTAP/Chol (6:1:3).

str. 149

Wykres 49: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5).

str. 150

Wykres 50: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów DPPC/DPPG (9:1).

str. 150

Wykres 51: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5).

str. 151

ZAŁĄCZNIK 1

Podstawowe właściwości fizykochemiczne wyznaczone dla chl *e* i chl *c* przedstawiono poniżej w tabelach 16 – 20. Szczegółowa analiza, wykresy oraz końcowe wnioski dotyczące położenia pasm absorpcji, emisji, kwantowej wydajności fluorescencji, czasu życia molekuł w stanie trypletowym oraz kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego znajdują się we wspomianej wcześniej pracy doktorskiej Pani Rams-Baron [97].

Tabela 16: Położenia pasm absorpcji oraz wartości molowego współczynnika absorpcji dla badanych związków rozpuszczonych w dimetylosulfotlenku [97].

Fotouczulacz	Położenie pasm absorpcji [nm]					
	Molowy współczynnik absorpcji $\varepsilon \cdot 10^4$ [M ⁻¹ ·cm ⁻¹]					
	Soret	Pasma Q				
Chl <i>e</i>	403 11.3	501 1.02	530 0.42	560 0.22	608 0.41	663.5 2.69
Chl <i>c</i>	406.5 8.72	503 0.82	533 0.48	560.5 0.31	609 0.40	666 2.31

Tabela 17: Położenia pasm emisji, wartości przesunięcia Stokesa oraz energii stanu singletowego wyznaczone dla badanych związków rozpuszczonych w dimetylosulfotlenku [97].

Fotouczulacz	Maksimum emisji [nm]	Przesunięcie Stokesa [nm]	Energia stanu singletowego E _s [kJ/mol]
Chl <i>e</i>	673	9.5	184
Chl <i>c</i>	674	8	182

Tabela 18: Wartości kwantowej wydajności fluorescencji otrzymane dla badanych związków rozpuszczonych w etanolu [97].

Fotouczulacz	Kwantowa wydajność fluorescencji Φ_{FL} [-]
Chl <i>e</i>	0.27
Chl <i>c</i>	0.25

Tabela 19: Średnie czasy życia molekuł fotouczulacza w stanie trypletowym oraz stała szybkości wygaszania dla badanych związków rozpuszczonych w etanolu [97].

Fotouczulacz	$\tau_{T,O_2} \pm \Delta\tau_{T,O_2}$ [μ s]	$\tau_T \pm \Delta\tau_T$ [μ s]	k_q [M ⁻¹ ·s ⁻¹]
Chl <i>e</i>	0.23 \pm 0.01	2.09 \pm 0.29	1.9·10 ⁸
Chl <i>c</i>	0.27 \pm 0.02	1.17 \pm 0.02	1.3·10 ⁸

Tabela 20: Kwantowe wydajności generowania tlenu singletowego dla badanych związków rozpuszczonych w etanolu [97].

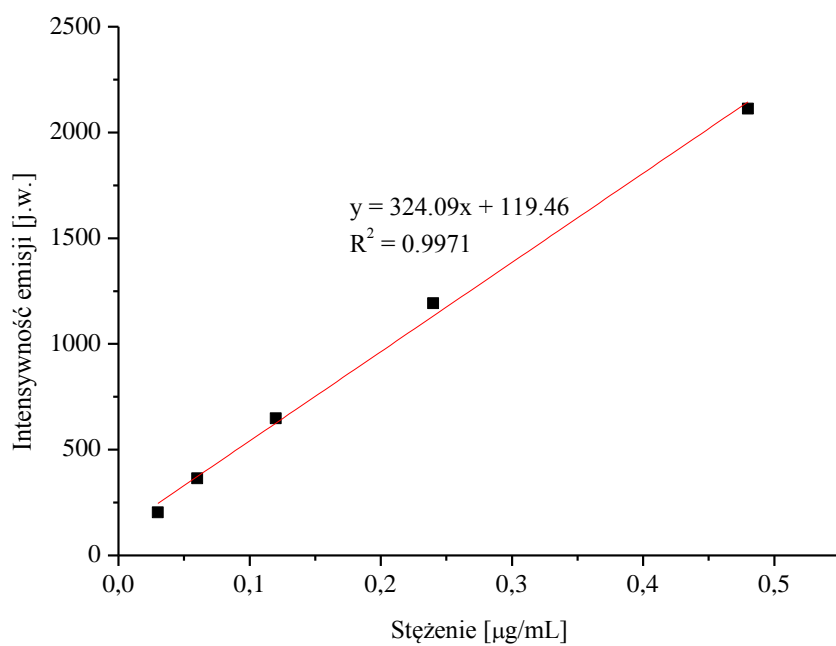
Fotouczulacz	Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego Φ_{Δ} [-]
Chl <i>e</i>	0.66
Chl <i>c</i>	0.63

ZAŁĄCZNIK 2

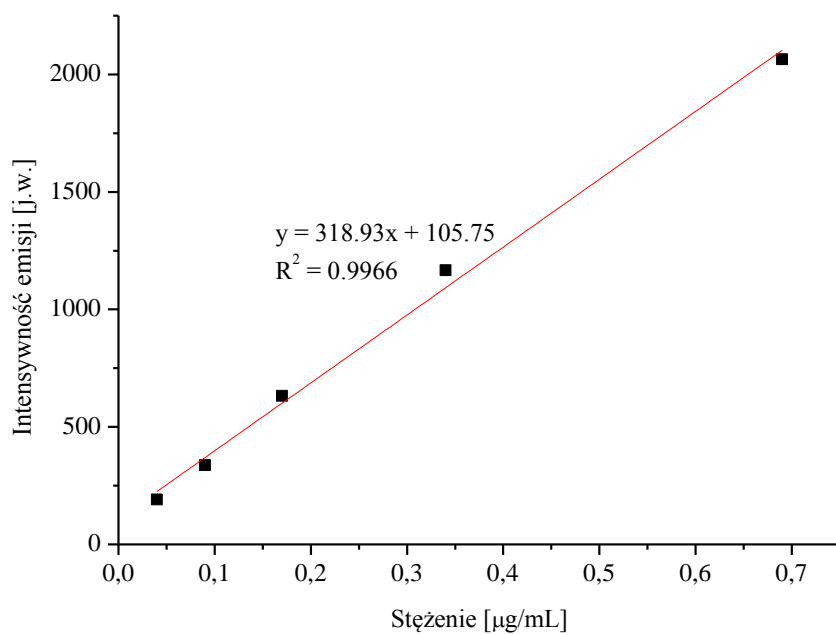
Do wyznaczenia stężenia fotouczulacza w zawiesinie liposomów wykorzystano metodę spektrofotometryczną. W pierwszym etapie eksperymentu wykreślono krzywe zależności intensywności emisji od stężenia dla badanych fotouczulaczy. Następnie wykonywano pomiar widm emisyjnych dla odpowiednio przygotowanych roztworów i przy wykorzystaniu krzywych kalibracyjnych określano stężenie związku. Poniżej w kilku punktach przedstawiono szczegółowy opis czynności wykonywanych w eksperymencie:

- 1) Wykreślenie krzywych kalibracyjnych dla badanych związków:
 - Przygotowano serię roztworów fotouczulaczy w stężeniu od 6.25 μM do 0.2 μM w etanolu.
 - Dla wszystkich próbek wykonano pomiar widm emisyjnych przy długości fali wzbudzającej 400 nm (pasmo Soreta) i odczytano wartości intensywności w maksimum emisji (dla chl *e* – 671.8 nm; chl *c* – 671.4 nm).
 - Wykreślono krzywe zależności intensywności emisji od stężenia dla każdego związku (Wykres 44 i 45).
- 2) Określenie stężenia fotouczulacza zamkniętego w liposomach:
 - Niewielkie ilości zawiesiny liposomowej rzędu mikrolitrów dodano do mililitra etanolu w celu rozpuszczenia dwuwarstwy fosfolipidowej i uwolnienia związku.
 - Następnie wykonywano pomiar widm emisji przy wzbudzeniu 400 nm.
 - Odczytywano wartości intensywności emisji przy 671.8 nm – chl *e* lub przy 671.4 nm – chl *c*.
 - Na podstawie krzywej kalibracyjnej określano stężenie badanego fotouczulacza.

Stężenie fotouczulacza zamykanego w nośnikach liposomowych określano dwukrotnie. Pierwszy pomiar wykonywano dla zawiesiny liposomowej uzyskanej bezpośrednio po uwodnieniu suchego filmu fosfolipidowego oraz drugi dla próbki przesączonej przez kolumnę wypełnioną żelą Sephadex G-50 Fine w celu usunięcia niezamkniętego związku.



Wykres 44: Krzywa kalibracyjna dla roztworu chl e w etanolu.



Wykres 45: Krzywa kalibracyjna dla roztworu chl c w etanolu.

ZAŁĄCZNIK 3

Metoda Stewarda wykorzystuje zdolność tworzenia rozpuszczalnego w chloroformie kompleksu fosfolipid-rodanek żelaza. Zaletą metody jest możliwość oznaczania stężenia fosfolipidów w buforach zawierających fosforany (PBS), natomiast ograniczeniem jest zależność tworzenia tego kompleksu od typu zastosowanego fosfolipidu. W celu wyeliminowania tej wady należy stworzyć krzywe kalibracyjne dla każdego lipidu lub ich mieszaniny [147].

Szczegółowy opis procedury wyznaczenia stężeń fosfolipidów wykorzystywanych w niniejszej pracy przedstawiony jest poniżej w dwóch etapach:

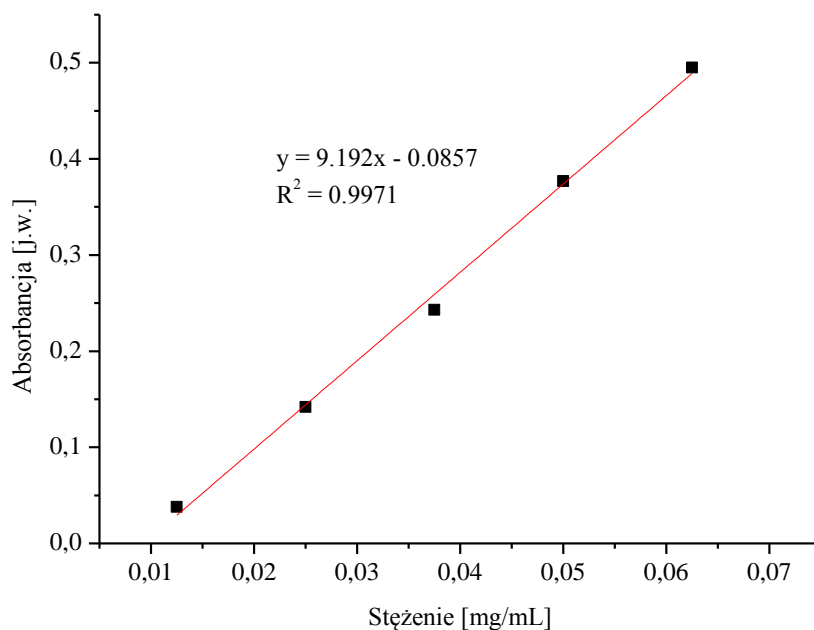
Etap I – krzywa kalibracyjna

- 1) Przygotowano roztwory mieszanin fosfolipidów używanych do preparatyki liposomów o stężeniu 1 mg/mL. Próbkę rozcieńczono 4-krotnie. Następnie do szklanych próbek okrągłodennych przelano odpowiednie ilości roztworów lipidów (0.1 mL; 0.2 mL; 0.3 mL; 0.4 mL; 0.5 mL) i uzupełniono chloroformem do objętości 2 mL.
- 2) Do każdej z probówek dodano po 2 mL roztworu tiocyjanianu żelaza III (rodanek żelaza III). Przygotowane próbki wortexowano przez 30 sekund. Następnie po rozdzieleniu faz, dolna warstwa chloroformowa przybiera barwę krwistoczerwoną, której intensywność zależy od stężenia fosfolipidów.
- 3) Zmierzono wartości absorbancji dla faz chloroformowych przy długości fali 485 nm. Pomiary na spektrofotometrze przeprowadzano względem próbki referencyjnej, którą była dolna faza mieszaniny chloroformu (2 mL) i rodanku żelaza (2 mL).
- 4) Wykreślono krzywe zależności absorbancji od stężenia fosfolipidów dla każdej mieszaniny lipidów (Wykresy 46 – 51).

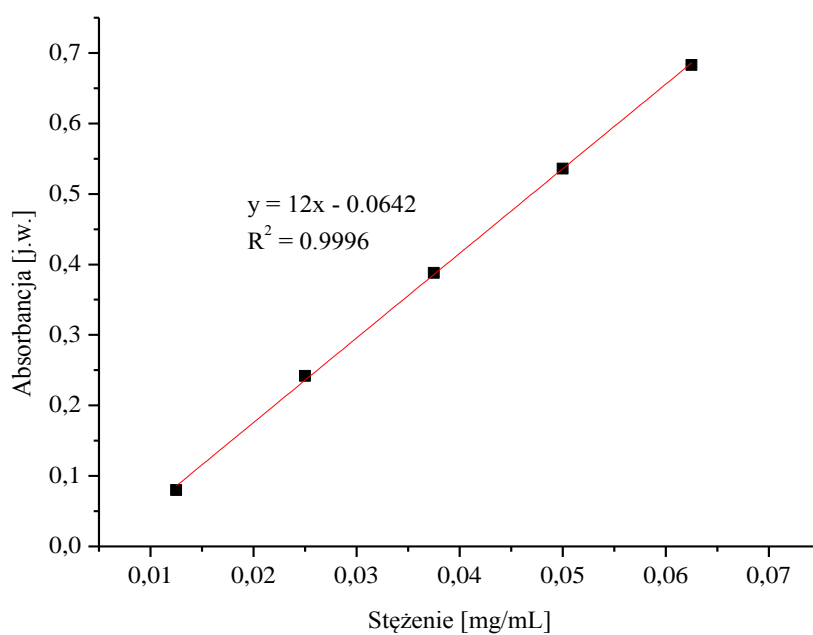
Etap II – próbka

- 1) Do szklanych probówek odpipetowano niewielkie ilości badanych zawiesin liposomowych i uzupełniono chloroformem do objętości 2 mL.
- 2) W kolejnym etapie do przygotowanych roztworów dodano po 2 mL rodanku żelaza III. Wymieszano i odczytano wartość absorbancji przy długości fali 485 nm dla dolnych faz chloroformowych.
- 3) Stężenie fosfolipidów dla badanych próbek określono na podstawie przygotowanych wcześniej krzywych kalibracyjnych.

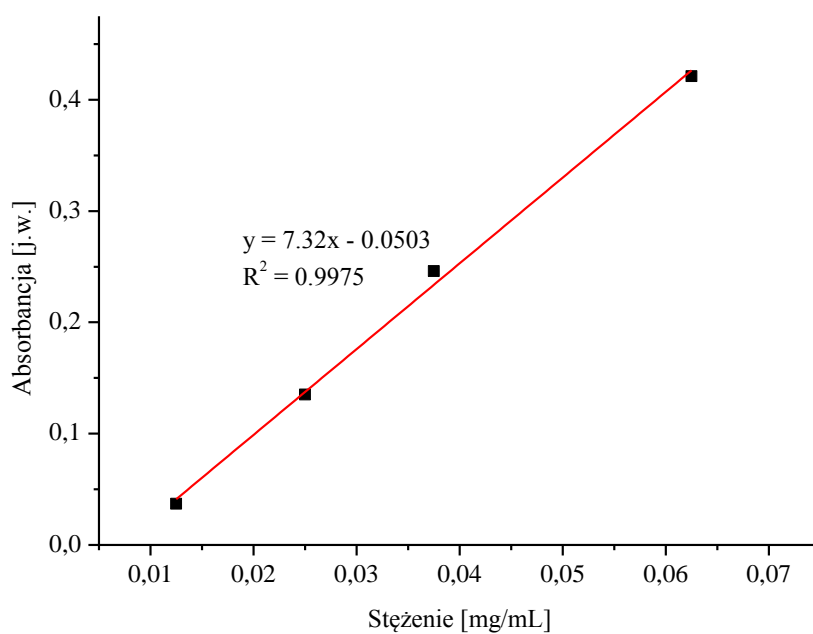
- 4) Stężenia fosfolipidów dla każdego typu liposomów określano dwukrotnie. Pierwszy pomiar wykonywano dla zawiesiny liposomowej uzyskanej bezpośrednio po uwodnieniu suchego filmu fosfolipidowego oraz drugi dla próbki przesączonej przez kolumnę wypełnioną żelą Sephadex G-50 Fine w celu usunięcia niezamkniętego związku.



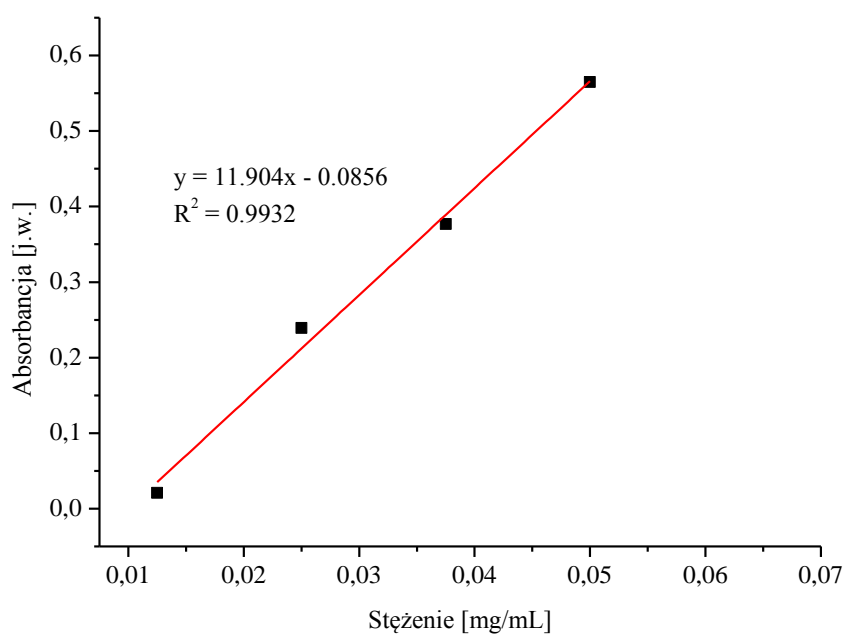
Wykres 46: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/Chol (7:3).



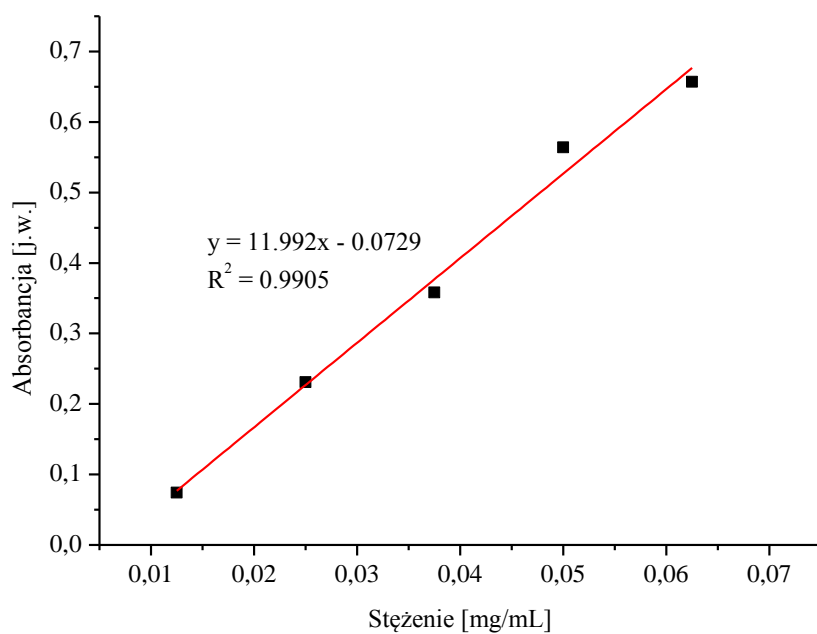
Wykres 47: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DSPE-PEG 2000 (9.5:0.5).



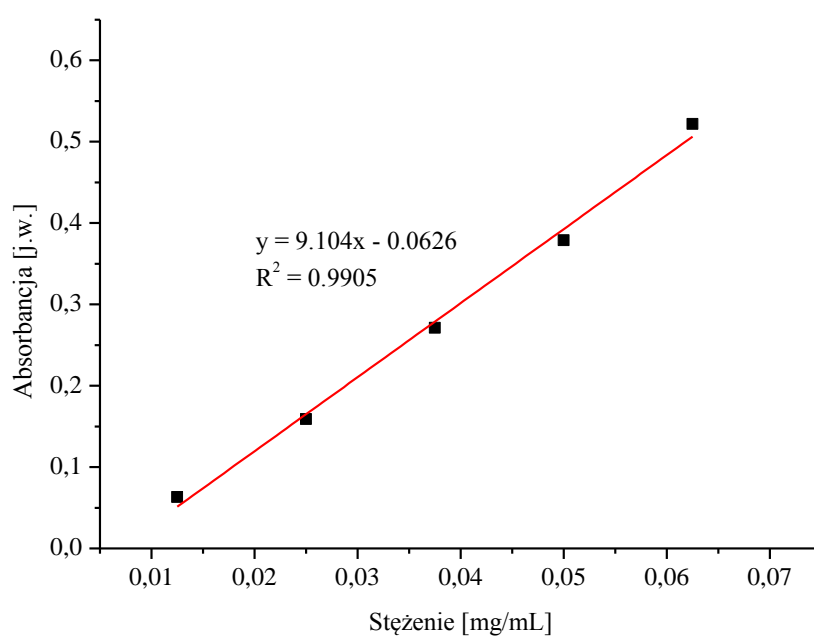
Wykres 48: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DOTAP/Chol (6:1:3).



Wykres 49: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DOTAP/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5).



Wykres 50: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów DPPC/DPPG (9:1).



Wykres 51: Krzywa kalibracyjna dla mieszaniny lipidów HSPC/DSPG/DSPE-PEG 2000 (8.5:1:0.5).